

Das Gift der Frühjahrsorchel
Helvella (Gyromitra)
esculenta FR. ex PERS.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Peter Luft

aus Gießen

Marburg 1967

Das Gift der Frühjahrsorchel
Helvella (Gyromitra)
esculenta FR. ex PERS.



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Peter Luft

aus Gießen

Marburg 1967



Gedruckt mit Unterstützung des Marburger
Universitätsbundes

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Philipps-Universität Marburg/Lahn
als Dissertation angenommen am: 18. 10. 1967
Tag der mündlichen Prüfung: 1. 11. 1967
Berichterstatter: Prof. Dr. P.H. List
Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Böhme

Edmund Schneider
in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	7
2. Theoretischer Teil	25
2.1. Isolierung des Giftstoffes	26
2.2. Strukturaufklärung des Gyromitrins	42
2.3. Synthese des Gyromitrins	50
2.4. Untersuchungen am Frischpilz	53
3. Diskussion	59
4. Experimenteller Teil	65
4.1. Isolierung des Giftstoffes	66
4.2. Strukturaufklärung des Gyromitrins	81
4.3. Synthese des Gyromitrins	86
4.4. Untersuchungen am Frischpilz	87
5. Zusammenfassung	89
6. Literaturverzeichnis	90

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1.1 Name und Aussehen des Pilzes

Die Frühjahrsorchel trägt den botanischen Namen *Gyromitra esculenta* FRIES ex PERSOON und gehört zur Familie der Helvellaceae innerhalb der Ascomycetenordnung der Pezizales. Früher wurde sie zur Gattung *Helvella* gerechnet und wird daher im älteren Schrifttum als *Helvella esculenta* PERSOON bezeichnet.

Zu den gebräuchlichsten Synonyma des Pilzes gehören die Namen Hasenmauroche, Lauerchen, Laurich, Lorchel, Frühorchel, Speisorchel, sowie Stockmorchel oder einfach Morchel (1,2). Gerade aber die letzten beiden Bezeichnungen sind verhängnisvoll irreführend, denn unter den Morcheln ist keine giftige Art bekannt, während die Frühjahrsorchel zu den gefährlichsten Giftpilzen zählt, ungeachtet der Tatsache, daß sie nach Abkochen und Weggießen des Kochwassers oft ohne Schaden genossen werden kann.

FRIESE (1) wendet sich mit Recht auch gegen die Benennung "Speisorchel", er schlägt außerdem vor, das Wort "esculenta" der botanischen Bezeichnung durch "vernalis" zu ersetzen.

Nach ihrem äußeren Habitus kann man jedoch die beiden Pilzfamilien auch bei oberflächlicher Betrachtung wohl kaum verwechseln. Die Morcheln weisen als Hauptmerkmal runde, sich konisch verjüngende Hüte auf, deren wabenartige, eingesenkte Kammern von erhabenen Leisten begrenzt sind. Dagegen ist der Hut der Frühjahrsorchel wulstig, gekröseartig gefurcht und unregelmäßig gehirnartig gewunden. Seine Farbe schwankt von hellrotbraun bis dunkelbraun, die Oberseite der dunkleren Typen trägt oft einen feuchten, violetten Schimmer. Der Hut mißt etwa 3-10 cm im Durchmesser und ist hohl. Das 1 mm dicke, gelblichweiße Hutfleisch zeigt auf der Innenseite vielgestaltige, weißlich be-

reifte bis zartfilzige Hohlräume. Auch der 2-9 cm hohe, höckerige oder flachgrubige, öfters längsgerippte, 1-5 cm dicke Stiel ist hohl. Jung ist er im Innern markig angefüllt. Die farblosen Sporen des Pilzes sind elliptisch, 17-22 μ lang und 8-22 μ breit (1).

Die frische Lorchel strömt einen köstlichen, verlockenden Pilzgeruch aus. Das wachsartige, brüchige Fleisch verliert auch durch Kochen oder Braten seine angenehme Festigkeit nicht. Es schmeckt so hervorragend, daß der Pilz als Delikatesse gilt.

1.2. Standort und Verbreitung

Die Frühjahrsorchel gehört zu den ersten Schwämmen, die nach dem Winter das Pilzjahr eröffnen. Bei milder Witterung findet man sie schon im März, gewöhnlich jedoch von April bis Mai in sandigen, feuchten Nadelwäldern, besonders unter Kiefern. Erdbewegungen scheint sie zu lieben, denn sie wächst oft an Wegrändern, an Gräben, auf Kahlschlägen und ähnlichen Veränderungen der Erdoberfläche.

Das Verbreitungsgebiet umfaßt ganz Mittel- und Osteuropa mit Schwerpunkt in Polen und Westrußland. Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Pilze stammten aus der Lüneburger Heide. Lediglich für die Versuche mit Frischpilzen konnten an zwei Stellen im Burgwald bei Marburg wenige Exemplare geerntet werden.

Daß die Frühjahrsorchel heute auf den Märkten der Bundesrepublik seltener geworden ist, hat wohl seinen Grund in der großen politischen Entfernung von den Hauptverbreitungsgebieten des Pilzes in Osteuropa. In Deutschland werden jedoch auch heute noch Lorcheln zu Konserven verarbeitet, und der hohe

Preis, z.Z. etwa 10.- DM/kg Frischpilz, zeigt, welcher Beliebtheit sich der Pilz unter den Feinschmekkern erfreut.

1.3. Delikatesse oder Giftpilz

In Bezug auf den Nährwert und den Eiweißgehalt, der durchaus mit dem wertvoller Speisepilze zu vergleichen ist, verdient die Frühjahrsorchel sehr wohl das Vertrauen der Genießer. Nach neueren Untersuchungen von LUFT und NOWACKA (3) beträgt der Nährwert 292,8 cal pro 100 g Trockensubstanz. Der Gehalt an verdaulichem Eiweiß wird von KARKOCHA und MLODECKI (4) mit 15% der Trockenmasse angegeben.

Leider ist die Frühjahrsorchel trotz dieser positiven Eigenschaften ein heimtückischer und gefährlicher Giftpilz, dessen Genuß schon mancher Feinschmecker mit dem Leben bezahlt hat. Nach einer Zusammenstellung von FRANKE (5), in der sämtliche in der Literatur zugänglichen Vergiftungsfälle von 1782-1965 referiert sind, starben von 513 vergifteten Personen 74 (14,5%) an den Folgen einer Orchelmahlzeit. (Es konnten sinngemäß nur Fälle berücksichtigt werden, bei denen die Gesamtzahl der Vergifteten angegeben war, insgesamt wurde von 114 Todesfällen berichtet.) GESSNER (5) gibt eine Letalität von 10-50% an. Bestürzend sind auch die Zahlen von ORLOV (7), der berichtet, daß von sämtlichen in der Sowjetunion amtlich registrierten Pilzvergiftungen 45%(!) auf die Wirkung der Frühjahrsorchel entfallen, davon 34,5%(!) mit tödlichem Ausgang. Danach ist also die Rate der Todesfälle der Orchelvergiftungen weit höher als bei anderen Giftpilzen. Sie wird nur noch von dem Grünen Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) mit einer Letalität von 50-70% (6) übertroffen.

Aber, und das ist das Rätselhafte an den Lorchelvergiftungen, nicht jeder erkrankt nach dem Genuß des Pilzes. So vertragen viele Menschen selbst rohe Lorcheln (SEIDEL (8)), während andere allein durch die bei der Zubereitung entstehenden Dämpfe gesundheitliche Schäden erlitten (PICK (9), TEODOROWICZ (10), STUHLFAUTH und JUNG (11)). Oft stellen sich schwere Vergiftungen nach jahrelangem beschwerdefreien Genuß ein (BOSTROEM (12), DITTRICH (13)). Auch sind Fälle bekannt, bei denen vorschriftsmäßig abgekochte, vom Kochwasser befreite Lorcheln zum Tode führten (HERZOG (14), UMBER (15), WELSMANN (16)).

Besonders gefährdet erscheinen Kinder und Frauen. So ergibt sich aus der Literaturübersicht von FRANKE, daß von den 51 Todesfällen, bei denen Angaben über Alter und Geschlecht gemacht wurden, 35 (68,6%) auf

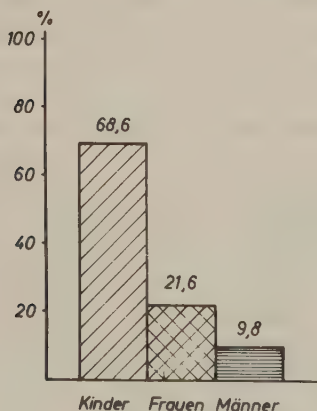


Abb. 1 Verteilung der Lorchelvergiftungen mit tödlichem Ausgang auf Alter und Geschlecht

Kinder, 11 (21,6%) auf Frauen und nur 5 (9,8%) auf Männer entfielen.

Auch Krankheiten und schlechter Ernährungszustand erhöhen die Empfindlichkeit gegen das Gift (UNGER (17)). Eine weitere Eigentümlichkeit der Lorchelvergiftung ist, daß in sehr vielen Fällen erst eine wiederholte Pilzmahlzeit nach vorangegangenen beschwerdefreien Genuß eines Lorchelgerichts zu schwersten Erkrankungen führte (BOSTROEM (12), DITTRICH (13), UMBER (15), GUTZEIT (18), WELSMANN (19), KALLENBACH (20)). Aus der Übersicht von FRANKE läßt sich wieder entnehmen, daß in 43 Fällen die erste Mahlzeit ohne jegliche Beschwerde vertragen wurde. Vergiftungssymptome, davon acht mit tödlichem Ausgang, stellten sich erst 7-10 Stunden nach dem Verzehr einer weiteren Lorchelzubereitung ein.

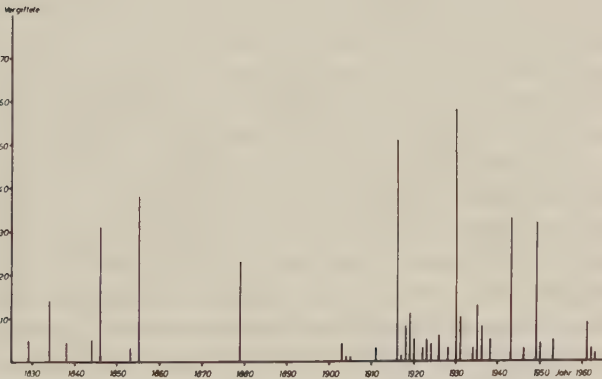


Abb. 2 Die Zahl der in der Literatur beschriebenen Lorchelvergiftungen in den einzelnen Jahren

Merkwürdig ist auch, daß die Vergiftungen mit *Gyromitra esculenta* in manchen Jahren besonders häufig auftreten. Ein solches Unglücksjahr scheint das Jahr 1930 gewesen zu sein, in dem acht Autoren über 58 Fälle (davon neun tödlich verlaufen) berichten.

1.4 Erforschung der Giftwirkung

Alle diese zunächst unerklärlichen Eigenschaften der Lorchel stifteten heillose Verwirrung und führten zu einer Fülle heute oft abenteuerlich anmutender Erklärungen. Man war um die Mitte des vorigen Jahrhunderts, als die ersten ausführlichen Berichte über Vergiftungen durch die Frühjahrsorchel publiziert wurden, weit davon entfernt, den Pilz als giftig anzusehen. Vielmehr genügte die Tatsache, daß er von vielen Menschen ohne Schaden vertragen wurde, ihn auch weiterhin zu den guten und ergiebigen Speisepilzen zu rechnen. Die beobachteten Erkrankungen schrieb man giftigen Insekten (SCHUELER (21)), unsachgemäßer, zu langer Lagerung (HUSEMANN (22)), mangelhafter Reinigung (KEBER (23)), Braten mit zu viel Fett (HUSEMANN (22)) und ähnlichem zu. LORINSER (24) ist der Meinung, daß die von Natur aus ungiftigen Lorcheln gelegentlich durch "klimatische Einflüsse" toxisch werden können. Selbst der große Pilzforscher KROMBHOLZ (2), der als erster ausführlich über zwei tödlich verlaufene Lorchelvergiftungen aus dem Jahre 1829 berichtet hatte, hielt die *Helvella esculenta* für unverdächtig. Vielmehr machte er für den Vorfall eine neue, bis dahin unbekannte, der Frühjahrsorchel zum Verwechseln ähnlich aussehende Art, die giftige *Helvella suspecta* KROMBHOLZ verantwortlich, deren Existenz aber schon damals von den Botanikern nicht anerkannt wurde. Erst die großen Arbeiten von BOSTROEM (12) und von PONFICK (25) schu-

fen hier durch wissenschaftlich exakte Versuche Klarheit.

BOSTROEM war 1879 bei der Sektion zweier Kinder, die an dem Gift der Frühjahrsorchel gestorben waren, auf die ihm unerklärlich scheinende Tatsache gestoßen, daß die Kinder erst nach der zweiten Pilzmahlzeit erkrankt waren. Das vorangegangene Lorchelgericht hatten sie und mit ihnen sämtliche Mitglieder zweier Familien ohne die geringsten Symptome einer Vergiftung vertragen. Außerdem waren die Pilze schon seit vielen Jahren am gleichen Standort gepflückt und ohne Schaden gegessen worden.

Um diese merkwürdigen Erscheinungen zu klären, verfütterte BOSTROEM Lorchelkochwasser an Hunde. Die Tiere starben unter dem Bild einer schweren Hämolyse. Daraufhin unternahm er systematisch weitere Fütterungsversuche, wobei er die massive Hämoglobininurie der Hunde als Indikator für die Giftwirkung benutzte. Er kam zu dem überraschenden Ergebnis: "den Lorcheln wohnt in der That immer ein verderbenbringendes Gift inne". Weiter stellte er fest, daß der toxische Stoff den Pilzen durch kaltes Wasser fast gar nicht, durch heißes Wasser jedoch fast vollständig entzogen werden kann. Außerdem entdeckte er, daß getrocknete Frühjahrsorcheln ungiftig sind. BOSTROEMs Angaben wurden durch die gleichzeitig, aber unabhängig von ihm durchgeführten Versuche von PONFICK (25) bestätigt.

Trotz dieser einwandfreien Befunde hielt die Verwirrung um die Giftigkeit der Lorchel weiter an. Ja, sie hat im Grunde nie aufgehört. Auch heute noch dürfen auf den Märkten der Bundesrepublik Frühjahrsorcheln ohne Warnung an nichtsahnende Hausfrauen verkauft werden. Bestürzend ist auch, daß der Bundesminister für Gesundheitswesen in den von ihm veröffentlichten Leitsätzen für Pilze und Pilzerzeugnisse vom 8. April 1965 für das Deutsche Lebensmittelbuch (26) die Gy-

romitra esculenta ausdrücklich als Speisepilz erwähnt.

Die Giftwirkung der Frühjahrslorchel auf den Menschen ähnelt sehr einer Intoxikation mit dem Grünen Knollenblätterpilz. Auch hier beherrscht die massive Leberschädigung weitgehend das Krankheitsbild. Vergleichbar sind auch die erheblichen Latenzzeiten.

Die ersten Vergiftungserscheinungen stellen sich frühestens 2 Stunden, in der Regel 6-8 Stunden, manchmal jedoch erst 24 Stunden nach der Lorchelmahlzeit ein: Mattigkeit, Kopfschmerzen, Völlegefühl im Magen, Leibschmerzen, Übelkeit. Sehr bald setzt dann heftiges, unstillbares, bis zu 2 Tagen anhaltendes Erbrechen ein, das in einigen Fällen von kolikartigen, wäßrigen Durchfällen begleitet ist. In diesem Stadium der Vergiftung wird eine mehr oder weniger starke Benommenheit beobachtet sowie in schweren Fällen Fieber über 39°C.

Regelmäßig tritt etwa 40 Stunden nach dem Genuß der Pilze als Zeichen der Leberschädigung Ikterus auf. Je nach Schwere des Vergiftungsbildes können alle Formen vom leichten Skleralikterus bis zum Ikterus gravis auftreten. Während in leichteren bis mittelschweren Fällen diese Erscheinungen in einigen Tagen zurückgehen und nur Druckempfindlichkeit und Vergrößerung der Leber meist noch etwas länger bestehen bleiben, zeigen die schwersten Vergiftungen das Bild einer subakuten bis akuten gelben Leberatrophy. Der Vergiftete wird zusehends schwächer und hilfloser. Die anfängliche Benommenheit steigert sich zur Bewußtlosigkeit. Daneben prägen schwere zentrale Erscheinungen das Krankheitsbild. Es treten tonisch-klonische Krämpfe, Trismus, Reflexstörungen, delirante Zustände sowie gellendes Schreien auf. Der Tod tritt etwa 2-3 1/2 Tage nach dem Lorchelgenuß unter Kreislaufkollaps und schweren Atemstörungen (Cyanose, Dyspnoe,

Cheyne-Stoke'sche Atmung) bei maximal erweiterten, reaktionslosen Pupillen im tiefen Koma ein.

Mit dem Ikterus geht eine Erhöhung des Serumbilirubins parallel. Im Harn treten neben Eiweiß und Aminosäuren Urobilin und Urobilinogen auf. Die beim Hund und beim Kaninchen im Vordergrund des Vergiftungsbildes stehende Hämoglobinurie wurde von den älteren Autoren beim Menschen nicht beobachtet. STUHLFAUTH und JUNG (11) konnten jedoch in ihren sehr sorgfältigen Untersuchungen nachweisen, daß bei schweren Fällen der Lorchelvergiftung etwa 3 Tage nach der Pilzmahlzeit ein Absturz der Hämoglobinwerte auf fast 50% stattfindet, der auch von Hämoglobinurie begleitet ist.

Außer den beschriebenen Symptomen der Intoxikation mit Frühjahrsorcheln wurde von Fällen berichtet, bei denen das Gift des Pilzes zu lokalen Reizerscheinungen am Auge führte. So erkrankten in einer Konservenfabrik in Königsberg ausschließlich Arbeiterinnen, die in der "Kaltwäsche" des Betriebes beschäftigt waren (PICK (9)). Zur Verhinderung von Bombagen der gefüllten Dosen bei der Lagerung wurden in diesem Arbeitsgang die zuvor überbrühten Orcheln in großen Becken mit kaltem Wasser übergossen, in das Luft eingepreßt wurde. Den dabei massenhaft entstehenden Schaum schöpften die Arbeiterinnen auf den Boden. Die Frauen erkrankten an Konjunktivitis, einer sehr schmerzhaften epithelialen Keratitis und langwierigen Entzündungen der Schleimhaut des Atmungs- und Verdauungstraktes. Auch STUHLFAUTH und JUNG (11) berichteten von einem ähnlichen Fall, bei dem der Koch einer militärischen Einheit allein durch das Zubereiten einer Lorchelmahlzeit an Kopfschmerzen und Brechreiz erkrankte.

Gerade diese Erscheinungen legen den Schluß nahe, daß der Giftstoff der Frühjahrsorchel möglicherweise ein flüchtiger Stoff ist. FRANKE litt bei ihren Arbeiten

mit Lorcheln und Lorchelextrakten öfters an Kopfschmerzen, Augenbrennen, Sehstörungen und Reizerscheinungen auf der Haut. Diese Beschwerden konnten nur durch das Vorhandensein eines flüchtigen Bestandteils in dem Pilz erklärt werden. Auch ich mußte bei meinen Experimenten mit Lorchelauszügen mit dieser unangenehmen Eigenschaft des Pilzes Bekanntschaft machen.

Schon BOSTROEM (12) hatte im Hinblick auf die Unschädlichkeit getrockneter Lorcheln den Verdacht ausgesprochen, der Giftstoff sei flüchtig. Nach GESSNER (6) besteht das toxische Prinzip aus 2 Komponenten, erstens aus einem unerforschten, möglicherweise flüchtigen Zellgift, das auf Grund seiner Wirkung mit dem Amanitin und Phalloidin des Grünen Knollenblätterpilzes verwandt sein könnte, und zweitens aus der hämolytisch wirkenden Helvellasäure. Der Autor läßt allerdings die Möglichkeit offen, daß beide Stoffe identisch sind. WELSMANN (27) schließt sogar aus der langen Latenzzeit auf einen dritten, den Bakterientoxinen nahestehenden Hauptwirkstoff.

1.5 Chemische Erforschung des Lorchelgiftes

Schon BOSTROEM hatte einige Versuche zur Isolierung des Lorchelgiftes unternommen. Als er jedoch erkennen mußte, daß der Verdampfungsrückstand des filtrierten Kochwassers ungiftig war, gab er diese Arbeit wieder auf.

Zwei Jahre später, 1883, begannen BOEHM und KUELZ (28) in Marburg als erste systematisch mit der Erforschung des Giftstoffes. Auch sie verwendeten für ihre Experimente Hunde als Versuchstiere. Die Autoren umgingen bald das aufwendige Arbeiten mit dem Kochwasser

des Pilzes durch mehrtägiges Mazerieren der frischen Lorcheln mit Äthanol. Die so gewonnene, giftige Tinktur wurde durch Vakuumdestillation bei einer 60°C nicht übersteigenden Temperatur vom Alkohol befreit und mit 6-8 Volumina Äther ausgeschüttelt. Der "fettreiche" Rückstand der Ätherphase erwies sich im Tierversuch ebenfalls als toxisch. Das Gift konnte ihm durch Behandeln mit heißem Wasser vollständig entzogen werden. Der wäßrige Extrakt reagierte stark sauer, reduzierte "alkalische Kupferoxydlösung" und enthielt Stickstoff. Außerdem bemerkten die Autoren, daß er beim Stehen an der Luft stark an Wirksamkeit verlor.

Wegen Schwierigkeiten bei der Trennung von Äther und Wasser durch Emulsionsbildung verließen BOEHM und KUELZ bei der Aufarbeitung einer neuen Charge Frühjahrslorcheln diesen Weg jedoch wieder. Sie trockneten nunmehr den Rückstand der Ätherausschüttelung "scharf im Vakuum über Schwefelsäure" und extrahierten ihn alsdann mit absolutem Äther. Der Rückstand dieses Ätherextraktes wurde anschließend mit dem 4fachen Volumen Äthanol versetzt. Nach Abfiltrieren des sich reichlich absetzenden Niederschlags zogen sie den Rückstand des Filtrats zweimal mit heißem Wasser aus (Extrakt I und II). Das dritte Ausziehen der verbliebenen "öligen Masse" nahmen sie mit Äthanol vor (Extrakt III). Alle drei Extrakte stellten einen hellgelben, klaren Sirup dar, der stark sauer reagierte. Er erwies sich als vollkommen stickstofffrei und reduzierte "alkalische Kupferoxydlösung" nicht mehr. Zur weiteren Reinigung wurden nochmals die in trockenem Äther und absolutem Äthanol unlöslichen Bestandteile abgetrennt und das Filtrat im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. 0,16 g dieses von den Autoren nunmehr als Reinsubstanz angesehenen Präparates bewirkten bei einem Hund von 5,27 kg Gewicht Hämoglobinurie. Aus der quantitativen Elementaranalyse berechneten sie die Summenfor-

mel $C_{12}H_{20}O_7$. Die Substanz reagierte sauer und bildete ein Bariumsalz, für das die Entdecker aus den Verbrennungswerten die Zusammensetzung $C_{12}H_{18}O_7Ba$ errechneten. Sie schlugen daher für den Giftstoff der Frühjahrsorchel die Bezeichnung Helvellasäure vor.

Aus dem beim Trocknen über Phosphorpentoxid eintretenden Gewichtsverlust sowie der gleichzeitig beobachteten Verfärbung des Trockenmittels folgerten sie, daß die Verbindung flüchtig sei.

Seitdem wird bis heute in der Literatur die Helvellasäure zumindest für die hämolytische Wirkung des Pilzes verantwortlich gemacht. Doch obwohl die Orchel auch weiterhin oft im Blickpunkt wissenschaftlichen Interesses stand, ist merkwürdigerweise die Arbeit von BOEHM und KUELZ in der Folgezeit niemals nachgearbeitet worden. Auch wurde nie der Versuch unternommen, die noch ausstehende Konstitution der Helvellasäure zu ermitteln. Schließlich verwundert das Fehlen einer kritischen Stellungnahme zu den Ergebnissen der Marburger Forscher.

Dabei fällt beim Studium der Arbeit auf, daß zwar die Wirksamkeit der Helvellasäure durch zwei Tierversuche geprüft worden war, daß aber anscheinend nur bei einem Hund Hämoglobinurie auftrat: "0,16 g vom Extrakt III bewirkten bei e i n e m Hund von 5270 g Gewicht Hämoglobinurie". Über das Ergebnis des zweiten Versuchs wird nichts berichtet. Warum wurde nur Extrakt III und nicht auch die Extrakte I und II in ihrer toxiologischen Wirksamkeit untersucht? Gerade das dritte Ausziehen des Ätherextrakts war ja unverständlicherweise mit Äthanol vorgenommen worden. Der Alkoholauszug konnte sehr wohl eine andere chemische Zusammensetzung haben als die beiden vorangegangenen wäßrigen Auszüge. Des weiteren läßt die Tatsache, daß die Helvellasäure nicht kristallin erhalten wurde, stark an der Reinheit der Substanz zweifeln. Sodann führt

die Berechnung der Analyse des Bariumsalzes nicht zu der Summenformel $C_{12}H_{18}O_7Ba$, wie BOEHM und KUELZ behaupten, sondern zu $C_{11}H_{18}O_8Ba$.

In den nun folgenden Jahrzehnten beschäftigt sich niemand ernsthaft mit der chemischen Erforschung des Lorchelgiftes. Erst 1931 fand AYE (29) bei der Untersuchung des ätherischen Öls von *Gyromitra esculenta* neben Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Schwefel auch geringe Mengen Stickstoff. Er vermutete ein "flüchtiges Alkaloid" und begann 1933 mit der Aufarbeitung von 30 kg frischer Lorcheln. Die Pilze wurden unter Zusatz von gelöschtem Kalk destilliert und das Destillat nach dem Ansäuern mit Salzsäure im Vakuum eingedampft. Danach wurde der Rückstand mit Kalilauge alkalisiert und mit Chloroform ausgeschüttelt. AYE erhielt geringe Mengen einer "wahrscheinlich" flüssigen, mäuseurinartig riechenden Substanz, die mit Alkaloidreagentien Fällungen oder Trübungen ergab. Er konnte den unbekannten Stoff in das Pikrat (0,01 g) überführen, das bei $145-150^{\circ}C$ schmolz. Die Elementaranalyse des allerdings nicht reinen Produkts führte zu den Bruttoformeln $C_{14}H_{15}N_5O_7$, $C_{14}H_{16}N_5O_7$, $C_{14}H_{17}N_5O_7$. Nach Subtraktion der Pikrinsäure resultierten die Basen $C_8H_{12}N_2$, $C_8H_{13}N_2$ oder $C_8H_{14}N_2$. Bemerkenswert ist auch, daß bei einer anschließend vorgenommenen Destillation von getrockneten Lorcheln nur Spuren des "flüchtigen Alkaloids" nachzuweisen waren. AYE vermutete einen Zusammenhang zwischen diesem Ergebnis und der Giftfreiheit der getrockneten Frühjahrslorcheln, ein Gedanke, der sich später als richtig erwies.

In drei Mitteilungen beschäftigte sich REIF (30) von 1935-1938 mit der Frühjahrslorchel. Er stellte fest, daß der Pilz im Gegensatz zu den Morcheln Stoffe enthält, die aus einer Lösung von Selendioxyd in Schwefelsäure rotes Selen abzuscheiden vermögen, und gründete darauf die nach ihm benannte Nachweisreaktion für

die *Gyromitra esculenta*. Die reduzierenden Substanzen konnten der frischen Lorchel durch Behandeln mit heißem Wasser vollständig entzogen werden. Machte man die Lösung alkalisch, so ließen sie sich mit Chloroform oder Äther ausschütteln. REIF fand weiter, daß das reduzierende Prinzip bei der alkalischen Destillation der Lorcheln in das Destillat überging und neben der Selenreaktion auch eine Rotfärbung von Fuchsinschwefliger Säure hervorrief. Wurde das Destillat jedoch angesäuert und nochmals der Destillation unterworfen, so reagierte die übergegangene Flüssigkeit nur noch mit der Fuchsinschwefligen Säure.

Ferner entdeckte der Autor, als er die Reduktionsfähigkeit von Frühjahrslorcheln verglich, daß das Trocknen bei hoher Temperatur (bis 120°C) oder in der Sonne die Reaktionsfähigkeit der Lorchel nicht beeinträchtigt. Durch Titration mit 0,1%iger Kaliumpermanganatlösung stellte er fest, daß erstens getrocknete und stark reduzierende Pilze ihre Reaktionsfähigkeit beim Liegen an der Luft verlieren, dabei übt das Anfeuchten mit Wasser eine beschleunigende Wirkung aus, zweitens die Abnahme der Reduktionsfähigkeit durch den Sauerstoff der Luft bedingt ist und drittens das Lorchelkochwasser auch nach Einleiten von Luft oder Sauerstoff reduzierend wirkt und sich daher das reduzierende Prinzip durch die Behandlung mit heißem Wasser chemisch verändert haben muß.

Auch REIF folgerte, daß der Verlust der Fähigkeit zu reduzieren parallel mit dem Verlust der Giftigkeit verlaufen müsse. Doch leider hat er keine Versuche unternommen, die die beschriebene Wirkung verursachenden Substanzen zu isolieren. Außerdem verwundert, daß er gerade die wichtige Behauptung, die Reduktionsfähigkeit des Pilzes bleibe durch Trocknen bei hoher Temperatur unverändert, nicht durch Analysenergebnisse untermauert. Denn diese Aussage steht im Widerspruch

zu der Meinung seiner Zeit, die in den Lorcheln einen flüchtigen Giftstoff vermutete.

Während AYE und REIF mehr oder weniger zufällig auf eigentümliche Reaktionen der Frühjahrslorchel gestoßen waren und sie dann näher untersucht hatten, begann FRANKE (5) ihre Arbeit mit dem Ziel, die Konstitution der Helvellasäure aufzuklären. Sie schlug einen Weg ein, der sich im wesentlichen an die Methode von BOEHM und KUELZ anlehnte, jedoch eine bessere Fraktionierung der sauren Lorchelinhaltsstoffe ermöglichte, also etwa dem STAS-OTTO-Gang entsprach. Leider mußte sie feststellen, nachdem sie in zweijähriger, mühseliger Arbeit mehr als 100 kg Pilze aufgearbeitet hatte, daß sämtliche Fraktionen ungiftig waren. Die Fraktion der starken Säuren, in der sich nach BOEHM und KUELZ die Helvellasäure befinden mußte, bestand zum größten Teil aus Fumarsäure.

Um Klarheit zu schaffen, ob dieses negative Ergebnis auf ungeeignete Arbeitsweise bei der Anreicherung des Giftstoffes zurückzuführen war oder auf den in der Literatur oft beobachteten Schwankungen der Giftigkeit der Lorchel beruhte, begann FRANKE ihre Untersuchungen von vorne. Diesmal prüfte sie jedoch jede wesentliche Stufe der Aufarbeitung tierexperimentell auf Toxizität.

Die Autorin konnte nunmehr die Angaben von BOEHM und KUELZ bestätigen, daß sich das Lorchelgift den Frischpilzen mit Äthanol entziehen läßt und daß der Ätherextrakt der vom Alkohol befreiten Pilztinktur stark toxisch wirkt. Die Versuchstiere starben sowohl nach peroraler Applikation dieses Extraktes als auch nach Einatmenlassen der über ihn streichenden Luft. Der giftige Bestandteil der Frühjahrslorchel mußte also recht flüchtig sein. Doch führten Destillationsversuche nur zur Isolierung von Acetaldehyd. Entgegen den Ergebnissen von BOEHM und KUELZ erwiesen sich auch die Heißwasserauszüge des Ätherextrakts als ungiftig.

Durch Ausschütteln der Endstufe mit 0,1 n NaOH konnte FRANKE den Giftstoff in die wäßrige Phase überführen. Dem genau neutralisierten NaOH-Auszug ließ sich das Gift mit Äther wieder entziehen. Mit diesem Versuch konnte sie wahrscheinlich machen, daß die toxische Substanz keine Säure ist, wie BOEHM und KUELZ behaupteten. Die Helvellasäure existierte folglich gar nicht. Was die Marburger Forscher 1885 als Giftstoff der Frühjahrslorchel postulierten, stellt allenfalls ein Gemisch ungiftiger Carbonsäuren dar, in der Hauptsache wohl Fumarsäure.

Eine weitere Anreicherung des Giftstoffes gelang der Dresdener Chemikerin nicht, jedoch stieß sie bei ihren folgenden Untersuchungen auf die α,α' -Äthylenoxiddicarbonsäure, die auch schon von SAKAGUCHI und Mitarbeitern (31) und von BIRKINSHAW und Mitarbeitern (32) aus niederen Pilzen isoliert worden war. Die Säure trat immer dann auf, wenn die Endstufe oder die folgenden Anreicherungsstufen mit heißem Wasser oder mit Alkali behandelt worden waren. In ungiftigen Fraktionen fehlte der Stoff. FRANKE zog daraus den Schluß, daß es sich bei der Epoxidverbindung möglicherweise um ein Hydrolyseprodukt des Giftstoffes handeln könne.

Die ungiftige Äthylenoxiddicarbonsäure kam als Träger der Giftwirkung nicht in Frage, aber das Vorhandensein größerer Mengen Stickstoff in den genannten Aufarbeitungsstufen gab Anlaß zu der Vermutung, der Giftstoff habe die Konstitution eines N-substituierten Äthylenoxid- α,α' -dicarbonsäureimids. Diese Hypothese wurde auch durch die Tatsache gestützt, daß N-alkylierte Maleinimide flüchtige und sehr toxische Verbindungen sind. So ist das Vergiftungsbild des N-Äthylmaleinimids fast identisch mit den Symptomen der Lorchelvergiftung: starke Hyperämie aller inneren Organe, Hämoglobinurie, Hämolyse, sowie Degenerationerscheinungen an Leber und Nieren.

FRANKE hat mit ihren sorgfältigen Versuchen die chemische Erforschung der Frühjahrslorchel auf eine neue, sichere Grundlage gestellt. Ihre Erkenntnis, daß die Helvellasäure gar nicht existiert, hat die Arbeit über das Lorchelgift in neue Bahnen gelenkt, die schließlich zu der Aufklärung des Pilzgiftes führten.

2. THEORETISCHER TEIL

2.1 ISOLIERUNG DES GIFTSTOFFES

2.1.01 Vorbemerkung

In Fortsetzung der Arbeit von FRANKE sollte versucht werden, mit Hilfe von Tierversuchen zu einer weiteren Anreicherung des Giftstoffes und schließlich zu seiner Isolierung zu gelangen.

Die Tierversuche wurden nur als Leitfaden für die Fraktionierung vorgenommen. Wenn Sektionen durchgeführt wurden, sollten sie in erster Linie sicherstellen, daß das Tier nicht etwa an einer Perforation des Schlundes oder des Magens durch die Sonde gestorben war.

2.1.02 Prüfung des Ausgangsmaterials auf Toxizität

Als Untersuchungsmaterial standen in der Lüneburger Heide gesammelte und zur Konservierung in Äthanol eingelegte Frühjahrsorcheln zur Verfügung. Bevor mit der Aufarbeitung größerer Pilzmengen begonnen wurde, überzeugte ich mich durch einen Tierversuch von der Giftigkeit der etwa ein Jahr lagernden Orcheln. Als Versuchstier benutzte ich ein Kaninchen. Zwar hatte BOSTROEM (12) aufgrund seiner Experimente behauptet, diese Tiere seien gegen das Orchelgift immun, doch sowohl BOEHM und KUELZ (28) als auch FRANKE (5) bezeichneten Kaninchen als brauchbare, gegen das Helvellagift sehr empfindliche Versuchstiere.

Zur Gewinnung des zu verabreichenden Extrakts preßte ich die Pilze aus und filtrierte die Preßflüssig-

keit klar. Sodann destillierte ich den Alkohol bei einer 45°C nicht überschreitenden Temperatur ab. Zur Vermeidung einer möglichen Oxydation wurde durch die Siedekapillare Stickstoff geleitet, so daß dieser Teil der Aufarbeitung unter vollständigem Luftabschluß durchgeführt werden konnte.

Eine 30% seines Körpergewichts an Frischpilzen entsprechende Menge dieses Extraktes verfütterte ich per Schlundsonde an ein Kaninchen (Tierversuch 1). Das Tier starb etwa 42 Stunden nach Verabreichung des Lorchelauszuges unter den von FRANKE beschriebenen Symptomen wie Hämoglobinurie, Ikterus, Atemnot, Lähmung der Hinterläufe und zentralen Krämpfen. Die Sektion ergab makroskopisch schwere Organschäden: Lungenödem, starke Veränderung der Leber und der Nieren. Die in Äthanol eingelegten Frühjahrslorcheln enthielten also noch den gesuchten Giftstoff.

2.1.03 Wahl des brauchbarsten Versuchstieres

Da Kaninchen verhältnismäßig teure und große Versuchstiere sind, untersuchte ich, ob auch kleinere Nager gegen das Gift der Frühjahrslorchel empfindlich sind. Ich verabreichte den Extrakt an eine Maus, eine Ratte und zwei Meerschweinchen. Die Tiere erhielten per Schlundsonde jeweils eine Menge Konzentrat, die 30% ihres Körpergewichts an Frischpilzen entsprach, mit Ausnahme der Maus, der eine 60% ihres Körpergewichts an Frischpilzen entsprechende Menge Extrakt intraperitoneal injiziert wurde.

Maus (Tierversuch 2) und Ratte (Tierversuch 3) zeigten keinerlei Anzeichen einer Erkrankung, während die Meerschweinchen (Tierversuch 4) beide starben. Die Vergiftungssymptome waren bei diesen Tieren jedoch

viel weniger ausgeprägt als bei dem Kaninchen. Hämoglobinurie und Krämpfe waren nicht zu beobachten. Bei der Sektion erschienen Leber und Nieren makroskopisch unverändert. Hämorrhagische Lungenentzündung und Lungenödem standen im Vordergrund des Vergiftungsbildes.

Meerschweinchen stellten somit brauchbare Versuchstiere dar. Alle weiteren Toxizitätsversuche führte ich daher mit diesen Tieren durch.

2.1.04 Ätherperforat I

Die Untersuchungen von BOEHM und KUELZ und von FRANKE hatten gezeigt, daß sich der Giftstoff mit Äther aus dem Extrakt ausschütteln läßt. Ich zog dem Ausschütteln jedoch die Perforation vor, da dieses Verfahren durch die kontinuierliche Extraktion mit frischem Lösungsmittel höhere Ausbeuten erwarten ließ. Das Ätherperforat prüfte ich wiederum an einem Meerschweinchen auf Toxizität. Zu diesem Zweck wurde der Äther eingedampft und der Rückstand in der gleichen Menge Wasser suspendiert. Da ich nicht wußte, wieviel von dem Giftstoff in den Äther übergegangen war, gab ich dem Tier sicherheitshalber eine seinem Körpergewicht an Frischpilzen entsprechende Menge der Zubereitung.

Das Meerschweinchen starb schon sechs Stunden nach der Fütterung unter schwersten Vergiftungssymptomen wie Atemnot, zentralen Krämpfen, Lähmung. Diesmal entsprach das Vergiftungsbild weitgehend dem des Kaninchens. Lediglich Hämoglobinurie konnte auch bei diesem Versuch nicht beobachtet werden (Tierversuch 5). Das Ätherperforat I mußte zumindest einen großen Teil des Lorchelgiftes enthalten.

2.1.05 Eigene Erfahrungen mit der Giftwirkung

Beim Aufarbeiten und Experimentieren mit den Lorchel-
auszügen ließ sich nicht vermeiden, daß ich etwas von
dem verdunstenden Äther einatmete. Auch die Feststel-
lung FRANKEs, der Giftstoff rieche nach Mäuseurin,
schien ein einfacher Indikator für das Vorliegen des
Giftes zu sein. so daß ich oft absichtlich an Frak-
tionen roch. Hierbei traten sehr unangenehme Wirkun-
gen des Giftstoffes auf.

Kurze Zeit nach dem Einatmen stellten sich Kopfschmer-
zen, Benommenheit, Arbeitsunlust und Müdigkeit ein.
Noch schlimmer waren die psychischen Erscheinungen.
Ich hatte nachts oft grauenhafte Alpträume, in denen
ich verfolgt wurde oder aber ekelerregende Tiere wie
glitschige Schlangen und Ratten auf meiner Bettdecke
zu sehen glaubte. Jedesmal erwachte ich schreiend und
in Schweiß gebadet. Bald arbeitete ich deshalb nur
noch mit Atemmaske.

Die schwersten Vergiftungssymptome stellten sich je-
doch ein, als ich unvorsichtigerweise in einem warmen,
ungelüfteten Kellerraum 1 Zentner in Alkohol eingeleg-
te Lorcheln auspreßte und filtrierte. Zu den bekannten
Beschwerden, die nun aber weit stärker auftraten, ge-
sellten sich Atembeschwerden und Stechen in der Brust.
Als sich mein Befinden nicht besserte, ließ ich mich
in der Poliklinik untersuchen. Dort konnte eine Er-
höhung der Transaminasen und somit das Vorliegen ei-
ner Leberschädigung ermittelt werden.

2.1.06 Wäßrige Ausschüttelung und Ätherperforat II

FRANKE konnte ihren Endstufen, die etwa meinem Äther-
perforat I entsprachen, durch Ausschütteln mit 0,1 n
NaOH den Giftstoff fast vollständig entziehen. Der

neutralisierte NaOH-Auszug erwies sich im Tierversuch als hoch toxisch, während der extrahierte Äther praktisch ungiftig war. Aus dem neutralisierten NaOH-Auszug wiederum ließ sich der Giftstoff mit Äther extrahieren und aus diesem wieder mit Wasser. Er war also sowohl wasser- als auch ätherlöslich. Daher erschien mir das Ausschütteln mit 0,1 n NaOH unnötig, zumal ich die Befürchtung hegte, daß der Zusatz von starkem Alkali womöglich zu chemischen Veränderungen der toxischen Substanz führen könnte. Diese Überlegung hat sich später als richtig erwiesen.

Ich schüttelte somit das Ätherperforat I mit äthergesättigtem Wasser in zehn kleinen Portionen aus. Die vereinigten wäßrigen Phasen befreite ich am Rotationsverdampfer vom restlichen Äther.

Auch diese Stufe der Aufarbeitung wurde am Meerschweinchen auf ihre Giftigkeit geprüft. Das Tier starb innerhalb von sieben Stunden unter den von Tierversuch 5 her bekannten Symptomen (Tierversuch 6). In einem weiteren Tierexperiment erwies sich die Ätherphase, ebenfalls wie bei FRANKE, als ungiftig (Tierversuch 7). Einen Teil des wäßrigen Auszugs perforierte ich wiederum mit Äther. Diese, im folgenden Ätherperforat II genannte Flüssigkeit zeigte sich ebenfalls im Tierversuch hoch toxisch (Tierversuch 8).

2.1.07 Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Ätherperforate

In diesem Stadium der Aufarbeitung zeigten sich die ersten Anhaltspunkte für eine mögliche Isolierung des Giftstoffes. Ich hatte nach Gewinnung des Ätherperforats I begonnen, dieses dünnschichtchromatographisch an Kieselgel zu trennen. Da die zu trennenden Stoffe

noch unbekannt waren, suchte ich nach einem Fließmittel, das eine möglichst gute Auftrennung der einzelnen Komponenten über die ganze Laufstrecke bewirkte, ohne daß ein Stoff an der Front mitlief. Weiterhin sollte das Fließmittel einen niedrigen Siedepunkt haben, damit es schneller verdampfte als der vermutlich flüchtige Giftstoff. Die gewünschte Eigenschaft hatte eine Mischung aus Methylenchlorid und Methanol im Verhältnis 9 : 1. Als Detektionsmittel diente Joddampf.

Beim Vergleich der Dünnschichtchromatogramme der beiden Ätherperforate ergab sich, daß von den vielen Flecken des Ätherperforats I die meisten im Chromatogramm des Ätherperforats II verschwunden waren oder doch stark an Intensität verloren hatten. Lediglich ein Fleck mit $R_f = 0,8$ war an Größe und Färbung geblieben.

2.1.08 Gaschromatographische Versuche

Ich stellte diese Beobachtung jedoch vorerst zurück, denn wenn der Giftstoff wirklich flüchtig war, sollte es nicht schwer sein, ihn mit Hilfe der Gaschromatographie schnell und elegant aus dem Ätherperforat zu isolieren.

Mir stand für meine Arbeit der präparative Gaschromatograph Autoprep 700 von Varian-Aerograph zur Verfügung. Da der Giftstoff durch seine Löslichkeit in Wasser und Äther recht polar zu sein schien, verwendete ich bei den ersten Versuchen eine polare Trennflüssigkeit, Polyäthylenglycol 20 000 (Carbowax 20 M). Als günstigste Säulentemperatur erwiesen sich 60°C . Ich erhielt reproduzierbare Gaschromatogramme mit jeweils 3 peaks außer dem Luftpeak bei den Retentionszeiten $t_r = 1,4$ Minuten, 12,0 Minuten und 26,7 Minuten. Ein-

spritzungen von Vergleichssubstanzen sowie orientierende Identitätsproben erhärteten die Vermutung, daß es sich in der Reihenfolge ihres Erscheinens um Äther, Äthanol und Wasser handelte. Die einzelnen peaks konnten jedoch noch andere Stoffe enthalten. Deshalb trennte ich in zehn Durchgängen 10 ml Ätherperforat II und finge die einzelnen Fraktionen getrennt auf.

Anschließend fertigte ich Dünnschichtchromatogramme von dem Inhalt jedes Auffanggefäßes, der einem peak im Gaschromatogramm entsprach. Nur mit peak 3, dem Wasserpeak, erschien, wenn auch in sehr geringer Menge, ein Stoff mit $R_f = 0,8$, der sich mit Joddampf fast schwarz färbte.

Meine Vermutung, daß es sich hierbei um dieselbe Substanz handeln könnte, die mir bei der Dünnschichtchromatographie des Ätherperforats II aufgefallen war und die den gleichen R_f -Wert hatte, konnte durch dünn-schichtchromatographischen Vergleich der beiden Stoffe bekräftigt werden. Merkwürdig war nur, daß ich lediglich einen Bruchteil der mit dem Ätherperforat II eingespritzten Substanzmenge gaschromatographisch gewinnen konnte, was ich wieder durch Vergleich der Dünnschichtchromatogramme ermittelte. Ein technischer Fehler schied aus, denn selbst den Äther gewann ich mit der vorhandenen Auffangvorrichtung fast vollständig wieder, und der Giftstoff konnte bei einer so langen Retentionszeit nicht flüchtiger als Äther sein.

Als auch die anderen vorhandenen Säulen mit Silicon-gummi (SE 30) und Wachs (Apiezon L) kein besseres Ergebnis brachten, wollte ich durch Entfernen des Wassers aus dem Ätherperforat II zu einer höheren Ausbeute der unbekannten Substanz (Arbeitsbezeichnung 382) kommen. Ich versetzte die ätherische Lösung mit Calciumchlorid. Am nächsten Tag hatte sich das Salz jedoch so stark gelb und rot verfärbt, daß ich das Perforat sicherheitshalber dünn-schichtchromatogra-

phisch überprüfte. Der gesuchte Fleck bei $R_f = 0,8$ war nicht mehr vorhanden.

Die anderen gebräuchlichen Trockenmittel zur Entfernung von Wasserspuren aus dem Äther schienen mir ebenfalls zu aggressiv. Ich wollte daher den Stoff 382 mit dem Wasser zusammen auffangen und gaschromatographierte an zwei Tagen 30 ml Ätherperforat II. Um jeden Verlust zu vermeiden, fing ich peak 3 in Tetrachlorkohlenstoff auf, aus dem selbst Wasserspuren leicht mit getrocknetem Natriumsulfat zu entfernen sind.

Die erhaltene Menge war jedoch so gering, daß sie nicht für ein Infrarot-Spektrum, noch weniger für einen Tierversuch ausreichte. Durch Anwendung der höchstmöglichen Verstärkung des Aufnahmegeräts erhielt ich wenigstens die Andeutung eines Spektrums, das die stärksten Banden ohne jedes Detail zeigte. Immerhin ergab die Auswertung eine Carbonylbande 1675 cm^{-1} .

Unter diesen Umständen brach ich die Gaschromatographie vorerst ab, das Ätherperforat II mußte noch weiter gereinigt werden.

2.1.09 Mikrodestillation nach PREGL

Als nächstes versuchte ich den Stoff 382 durch Vakuumdestillation aus dem Rückstand des Ätherperforats II zu gewinnen. Ich benutzte dazu die Mikroapparatur nach PREGL (33). Es destillierte nur wenig Flüssigkeit über, die aus Äthanol und einer sauer riechenden Substanz bestand, die nicht näher untersucht wurde. Von der gesuchten Verbindung war in dem Destillat dünnschichtchromatographisch nichts zu entdecken, sie fehlte auch im Destillationsrückstand.

2.1.10 Chromatographie an der Kieselgelsäule

Da der Stoff 382 dünn-schichtchromatographisch leicht trennbar war, lag der Gedanke nahe, ihn aus dem Ätherperforat II durch Chromatographieren an einer Kieselgelsäule zu isolieren. Vorversuche mit Dünnschichtplatten ergaben, daß reiner Äther als mobile Phase sehr gut geeignet war. Die gesuchte Substanz hatte mit 0,5 den größten R_f -Wert, die anderen Stoffe erschienen erst mit einigem Abstand, während die Hauptmasse des Ätherperforat II-Rückstandes am Startpunkt zurückblieb.

Jede der gewonnenen 10 ml Fraktionen wurde an Dünnschichtplatten rechromatographiert und die Lösungen mit Stoffen gleichen R_f -Wertes vereinigt (Äthereluat). Der so erhaltene Stoff 382 stellte nach Entfernen des Äthers eine gelbliche Flüssigkeit von der Viskosität dünnen Öls dar, die einen eigentümlichen, am ehesten an Schokolade erinnernden Geruch besaß. Nach dem Riechen stellten sich bei mir wieder lang andauernde, heftige Kopfschmerzen ein.

Die Prüfung dieser Flüssigkeit im Tierversuch ergab das schwerste Vergiftungsbild der gesamten Versuchsreihe. Die Krämpfe waren diesmal so stark, daß das Meerschweinchen bei Beginn eines Krampfanfalles regelrecht in die Luft geschleudert wurde. Das Tier starb schon eine Stunde und fünfzig Minuten nach der Fütterung (Tierversuch 9).

2.1.11 Das Lorchelgift wirkt durch Einatmen giftig

Um weiterhin zu prüfen, ob der Stoff 382 auch durch Einatmen giftig wirkte, wiederholte ich einen Versuch, den FRANKE schon einmal mit einer meinem Ätherperforat I entsprechenden Fraktion durchgeführt hatte. Ich

setzte ein Meerschweinchen in einen doppelt tubulierten Exsikkator, durch den ich mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe langsam Luft leitete, die vorher über den Rückstand des Äthereluats gestrichen war. Auch diesmal starb das Tier (Tierversuch 10).

Dieser Versuch ließ auch erkennen, wie empfindlich der Giftstoff gegen Luft ist. Schon eine Stunde nach Versuchsbeginn hatte sich der von der Luft langsam überströmte Rückstand des Äthereluats in eine braune Schmiere von maggiähnlichem Geruch verwandelt, in der der Giftstoff dünn-schichtchromatographisch nicht mehr nachzuweisen war.

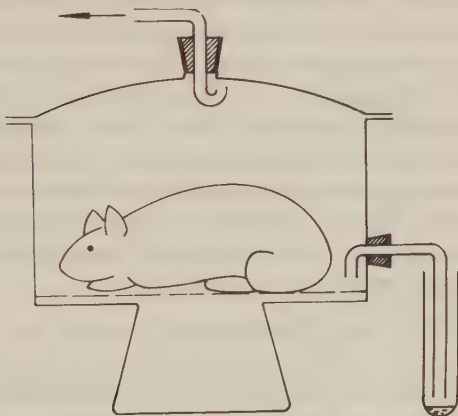


Abb. 3 Versuchsanordnung zur Begasung eines Meerschweinchens mit Lorchelgift

2.1.12 Weitere gaschromatographische Versuche

Das Infrarot-Spektrum der giftigen Substanz stimmte mit den wenigen Banden, die man auf dem früheren Spektrum sehen konnte, völlig überein. Jedoch ließ eine sehr starke Absorption bei 3520^{-1} , die auf dem ersten Spektrum fehlte, auf Verunreinigungen mit Wasser oder Äthanol schließen. Um das zu prüfen und gegebenenfalls diese Begleitstoffe abzutrennen, wurde das Äthereluat gaschromatographiert.

Auch diesmal erzielte ich mit der Carbowaxsäule die beste Trennung. Da es mir inzwischen gelungen war, ein geeignetes Trockenmittel (Sikkon Fluka) zu finden, war der Wasserpeak verschwunden, und die giftige Substanz erschien bei 85°C Säulentemperatur mit einer Retentionszeit von 3,4 Minuten. Außerdem zeigte das Gaschromatogramm einen Äthanolpeak bei einer Retentionszeit von 6,9 Minuten. Die quantitative Auswertung (Höhe x Halbwertsbreite) ergab 1,2% Stoff 382 und 10,5% Äthanol. Trotzdem konnte ich wieder nur Spuren der gesuchten Substanz auffangen. Dieser Widerspruch ist nur dadurch zu erklären, daß der Stoff im Detektor zum größten Teil zerstört wird. Daher gab ich die Gaschromatographie bald wieder auf.

Ich hatte in dem alkoholischen Auszug der Frühjahrsorchel einen Stoff gefunden, der sich im Tierversuch als hochtoxisch erwiesen hatte. Ich kannte sein Infrarotspektrum, sein gaschromatographisches Verhalten, ich konnte ihn dünnschichtchromatographisch verfolgen. Aber es gelang mir vorerst nicht, ihn von dem wohl noch aus der Lorcheltinktur stammenden und durch alle Aufarbeitungen mitgeschleppten Äthanol sowie von den bei Berührung mit Luft entstehenden braunen Verfärbungen zu befreien. Um zu einer Reindarstellung des Giftstoffes zu kommen, mußten zunächst größere Mengen des Rohprodukts gewonnen werden.

2.1.13 Vakuumdestillation und Schichtchromatographie

Durch die Entdeckung, daß die giftige Substanz im Feinvakuum ab etwa 0,5 Torr bei Zimmertemperatur, also ohne zusätzliche Heizung, verhältnismäßig leicht flüchtig ist, ohne sich zu zersetzen, konnte ich jetzt direkt aus dem ätherfreien Ätherperforat I durch Anlegen eines Vakuums und starkes Kühlen der Vorlage erheblich mehr Substanz aus einer Charge gewinnen, als durch die vorherige, komplizierte und wohl auch verlustreiche Aufarbeitung.

Das bei dieser isothermen Destillation übergegangene Destillat war leider nicht rein. Es enthielt neben Äthanol noch einen sauren, schweißähnlich riechenden Stoff, der im Dünnschichtchromatogramm einen R_f -Wert von 0,5 aufwies. Ich trennte ihn daher schichtchromatographisch von dem Stoff 382 ab und gewann eine viskose, fast farblose, lediglich leicht gelbliche Flüssigkeit, die bei etwa -10°C kristallinisch erstarrte. Auch hier zeigten Infrarot-Spektrum und Gaschromatogramm wieder Verunreinigungen mit Äthanol, die allerdings geringer waren als bei dem durch Säulenchromatographie gewonnenen Präparat.

2.1.14 Reindarstellung des Giftstoffes

Die Schwierigkeiten einer Reindarstellung des Giftstoffes resultierten aus seiner großen Thermolabilität und aus der geringen Menge, die rektifiziert werden mußte. Ein großes Problem stellte auch die Luftempfindlichkeit des Stoffes dar, der sich schon nach kurzer Luftberührung erst gelb und später braun verfärbte. Nach vielen vergeblichen Versuchen fand ich dann einen einfachen Weg zur Isolierung.

Vorbild war die oben beschriebene Vakuumdestillation. Ich ging von der Überlegung aus, daß die beiden Komponenten Äthanol und Giftstoff sehr unterschiedliche Schmelzpunkte haben (Äthanol -114°C , Der Giftstoff höher als -10°C). Sie verdampften zwar als Flüssigkeiten gemeinsam, aber es mußte möglich sein, bei einer tieferen Temperatur den Giftstoff als höher schmelzenden Bestandteil auszufrieren, während das Äthanol flüssig blieb. Da Festsubstanzen im allgemeinen recht niedrige Dampfdrucke haben, sollte es gelingen, den Alkohol zu verdunsten, ohne daß nennenswerte Mengen des Giftstoffes mit übergehen.

Ich ließ mir daher nach meinen Angaben die abgebildete Apparatur bauen, die es gestattete, auch kleinste Mengen des Giftstoffes rein zu isolieren und ohne Berührung mit der Luft in Ampullen einzuschmelzen.

Die Anlage bestand aus zwei U-Rohren, von denen eins mit drei angeschmolzenen Ampullen versehen war. Als Verbindung dienten Schliffteile. Jeder Schenkel eines Rohres war mit einem Hahn verschließbar.

Der durch Schichtchromatographie vorgereinigte Giftstoff wurde in den Kolben K gebracht. Nachdem durch Evakuieren der Apparatur und Kühlen des U-Rohres U_1 ein Teil des Giftstoff-Äthanol-Gemisches in die Vorlage übergetrieben war, schloß ich Hahn 1 und entfernte die Kühlung von U_1 . Dabei verdunstete ein Teil der kondensierten Flüssigkeit, und es bildeten sich lange, weiße Kristalle, die als Impfkristalle bewirkten, daß sich nach Öffnen des Hahns 1 unter erneuter Kühlung die Innenseite des dem Kolben zugewandten Schenkels von U_1 bald mit einem Netz von Kristallen überzog, während sich am Boden des U-Rohrs weitere Flüssigkeit ansammelte. Als kein Giftstoff mehr überging, schloß ich Hahn 1 wieder und erreichte durch mehrmaligen Wechsel zwischen Kühlen und Entfernung der Kühlung, daß bald alle Flüssigkeit verdunstet war. Auf die

gleiche Weise wurde nun der Inhalt von U_1 in das U-Rohr U_2 überführt. Hier brachte ich die Kristalle durch vorsichtiges Erwärmen mit der Hand zum Schmelzen. Die Flüssigkeit verteilte ich auf die drei Ampullen, die ich anschließend abschmolz.

Dieses Verfahren ermöglichte die Gewinnung von etwa 150 mg reinem Giftstoff. Das Infrarot-Spektrum zeigte keine OH-Bande mehr, und die folgenden Versuche zur Ermittlung der Strukturformel bestätigten die Reinheit.

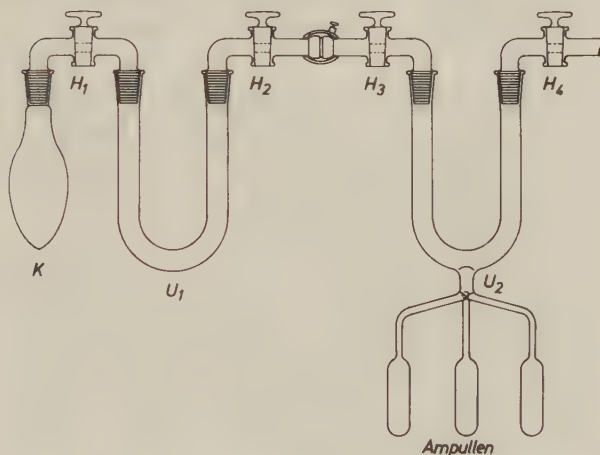


Abb. 4 Apparatur zur Reindarstellung des Lorchelgiftstoffes

2.1.15 Verbesserte Aufarbeitungsmethode zur Gewinnung des Giftstoffes

Später fand ich zur Gewinnung des Giftstoffes aus der Lorcheltinktur ein eleganteres Verfahren. Bei meinen Arbeiten mit dem Gift zeigte sich, daß es besonders

mit Lösungsmitteln zusammen recht flüchtig ist. Der beste Indikator war dabei meine Empfindlichkeit gegen das Gift. Schon einmaliges, kurzes Riechen an einer giftstoffhaltigen Fraktion machte sich bei mir als Kopfschmerz und Atembeklemmung bemerkbar. Es schien mir daher durchaus möglich, daß der toxische Stoff auch mit Wasserdampf flüchtig ist. Zwar hatte FRANKE schon versucht, ihn durch Wasserdampfdestillation zu isolieren, aber ohne Erfolg, weil, wie ich jetzt wußte, der Giftstoff sich bei der dabei auftretenden Temperatur zersetzte. Bei einer Vakuumdestillation jedoch konnte er möglicherweise unzersetzt mit Wasser zusammen verdampfen.

Ich prüfte daraufhin das beim Einengen der Lorcheltinktur nach Entfernung des Alkohols anfallende wäßrige Destillat durch Ätherperforation auf das Vorhandensein der gesuchten Substanz. Tatsächlich erhielt die sonst verworfene Flüssigkeit so große Mengen an Giftstoff, daß ich ihn künftig nur noch nach diesem Verfahren gewann, indem ich den Lorchelextrakt bis zur Konsistenz eines dicken Öles destillierte. Die Ausbeute war zwar etwas geringer als die mit dem bisherigen Verfahren erzielte, aber dieser Nachteil wurde durch den wesentlich kleineren Aufwand und vor allem durch die große Zeitersparnis mehr als aufgewogen.

2.1.16 Abschließender Tierversuch

Mit dem reinen Giftstoff führte ich einen letzten Tierversuch durch (Tierversuch 11), um seine Toxizität zu beweisen. Auch diesmal starb das Meerschweinchen unter schwersten Vergiftungssymptomen in kurzer Zeit.

Frühjahrslorcheln mit Äthanol mazerieren

Gewinnung der Lorcheltinktur durch Auspressen der Pilze

Abdestillieren des Äthanol im Vakuum

wäßrigen Rückstand mit Äther perforieren (Ätherperforat I)

Verfahren 1

Ätherperforat I mit Wasser ausschütteln

wäßrige Phase mit Äther perforieren (Ätherperforat II)

Ätherperforat II an Kieselgel chromatographieren (Äthereluat)

Äther entfernen und Rückstand in Vakuumdestillationsanlage destillieren

GYROMITRIN

Verfahren 2

Äther abdestillieren und Rückstand im Feinvakuum destillieren

Destillat an Kieselgel schichtchromatographieren und ausgeschabte Schicht mit Äther eluieren

Äther entfernen und Rückstand in Vakuumdestillationsanlage destillieren

GYROMITRIN

Verfahren 3

Abdestillieren des restlichen Wassers im Vakuum

Destillat mit Äther perforieren

Äther entfernen und Rückstand in Vakuumdestillationsanlage destillieren

GYROMITRIN

Schema der Aufarbeitung der Frühjahrslorchel zur Gewinnung des Giftstoffes

2.2 STRUKTURAUFKLÄRUNG DES GYROMITRINS

2.2.01 Name, Aussehen, physikalische Konstanten

FRANKE, FREIMUTH und LIST (34) haben für den Giftstoff der Frühjahrslorchel in Anlehnung an die botanische Bezeichnung *Gyromitra esculenta* den Namen Gyromitrin vorgeschlagen.

Gyromitrin stellt eine farblose, bei Zimmertemperatur flüssige Substanz dar. Sie hat etwa die Viskosität dünnflüssigen Speiseöls und kristallisiert bei Kühlung in tetragonalen, prismatischen, quaderförmigen Kristallen, die in der Ampulle unter Vakuum bei $19,5^{\circ}\text{C}$ schmelzen. Der Siedepunkt des Giftstoffes konnte wegen seiner leichten Zersetzlichkeit nicht ermittelt werden. Bei Versuchen mit der Mikromethode nach EMICH (35) färbte sich das Gyromitrin ab 60°C braun und verharzte zusehends bei steigender Temperatur. Nach meinen Erfahrungen würde ich als Siedepunkt etwa $120-150^{\circ}\text{C}$ schätzen. Gyromitrin ist bei Zimmertemperatur recht flüchtig, es sublimiert im Hochvakuum.

Der Giftstoff besitzt einen sehr schwachen, eigentümlichen Geruch, der etwas an Schokolade erinnert. Er ist löslich in Wasser, Methanol, Äthanol, Aceton, Essigester, Äther, Chloroform, Benzol, Methylenchlorid und Tetrachlorkohlenstoff.

2.2.02 Chemisches Verhalten, Prüfung auf funktionelle Gruppen

Wie vorher schon erwähnt, ist Gyromitrin sehr empfindlich gegen Luftsauerstoff. Erst bei -25°C nimmt diese Autoxydation merklich ab. Das Oxydationsprodukt

stellt eine braune Schmiere dar, die nach Maggi riecht. Auffallend ist auch die leichte Zersetzlichkeit bei Temperaturen oberhalb 50°C.

Beim Lösen von Gyromitrin in Wasser, wie es für die Tierversuche oft notwendig war, trat manchmal intensiver Geruch nach Acetaldehyd auf. Der gleiche Geruch entstand beim Behandeln mit verdünnten Säuren. Um das Entstehen von Acetaldehyd sicherzustellen, wurde etwas Gyromitrin mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens versetzt. Es fiel ein gelber Niederschlag, der zweimal umkristallisiert bei 150°C schmolz. Der dünnschichtchromatographische Vergleich mit authentischem Acetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon ergab gleiche Laufstrecken.

Als zweites Bruchstück wurde bei der alkalischen Hydrolyse ein Amin gefunden, das alkalische Kaliumpermanganatlösung reduzierte. Schon früher war bei der alkalischen Hydrolyse des Ätherperforats II ein aminartiger Geruch aufgetreten. Die Isonitrilreaktion fiel positiv aus. Bei dem Versuch, das oder die unbekannten Amine papierelektrophoretisch zu identifizieren, konnte nur ein Fleck erhalten werden, der sich mit Ninhydrin etwas ungewöhnlich anfärbte. Die der Startlinie abgewandte Seite des Flecks war violett wie bei einem primären Amin, die gegenüberliegende Seite dagegen mehr gelblich, ähnlich der Farbe sekundärer Amine. Die Laufstrecke entsprach ziemlich genau der des Äthylamins. Da man bei der Elektrophorese innerhalb einer homologen Reihe von der Laufstrecke auf die Größe des Moleküls schließen kann, vermutete ich, daß es sich bei dem Hydrolyseprodukt um ein primäres, ungesättigtes Amin mit einem Molekulargewicht von ca. 40 handelte. Der Vergleich mit einer großen Zahl von Aminverbindungen verlief negativ. Andere funktionelle Gruppen ließen sich zunächst nicht nachweisen.

2.2.03 Qualitative und quantitative Elementaranalyse

In der Verbindung konnte außer Kohlenstoff und Wasserstoff nur noch Stickstoff nachgewiesen werden.

Die quantitative Elementaranalyse ergab die Summenformel $C_4H_8N_2O$, Molekulargewicht 100,12 oder ein Vielfaches davon:

4,028 mg Substanz, 7,050 mg CO_2 , 2,890 mg H_2O
3,267 mg Substanz, 0,837 ml N_2 bei 725 Torr, $28^\circ C$
gefunden: 47,76% C, 8,03% H, 27,72% N
berechnet: 47,98% C, 8,05% H, 27,98% N.

Nach der Unsättigungszahl $R = 1 - N + 1/2 \sum n_i$ $V_1 = 2$ (36) sollte das Gyromitrin zwei Doppelbindungen oder zwei Ringe enthalten.

2.2.04 Massenspektrum und Infrarot-Spektrum

Die Ergebnisse der Elementaranalyse wurden durch das Massenspektrum bestätigt. Seine Auswertung führte ebenfalls zu der Summenformel $C_4H_8N_2O$. Das Molekülion erschien bei der Massenzahl 100. Da der Giftstoff stickstoffhaltig ist und Stickstoff als einziges unter den vorhandenen Elementen eine ungeradzahlige Wertigkeit bei geradzahligem Atomgewicht hat, mußte Gyromitrin mindestens zwei Stickstoffatome besitzen. Aus dem Verhältnis der Spitze des Molekülions mit der Isotopenspitze $M + 1$ ($\frac{10}{24 \cdot 1,08} = 3,9$) resultierten vier Kohlenstoffatome.

Das Infrarot-Spektrum zeigte bei 1675 cm^{-1} eine starke Carbonyl-Absorption. Ich interpretierte sie ihrer Lage nach als Amidbande I eines tertiären Amids. Das Fehlen von NH-Valenzschwingungen erhärtete diese Vermutung und ließ außerdem erkennen, daß sämtliche Protonen im Gyromitrin an Kohlenstoffatome gebunden sein

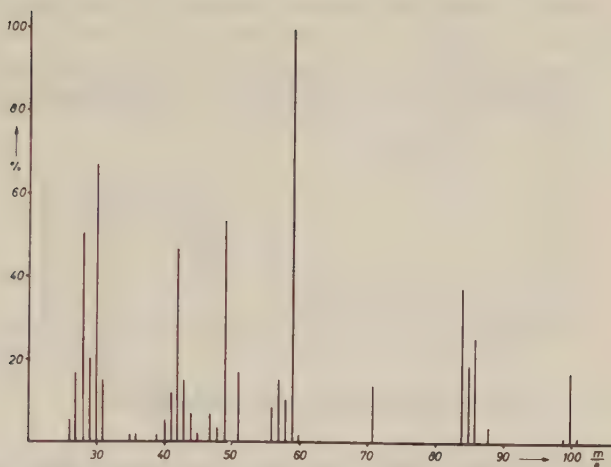


Abb. 5 Massenspektrum des Gyromitrins

mußten. Eine weitere starke Bande bei 1620 cm^{-1} wurde als C=N-Valenzschwingung gedeutet.

2.2.05 Kernresonanz-Spektrum

Weitere wichtige Aufschlüsse brachte das Kernresonanzspektrum. Die Signale lagen bei 1,67 ppm (T) S, 2,99 ppm (T) Q, 7,27 ppm (T) S und 8,44 ppm (T) D. Die Integration der Kurven ergab ein Protonenverhältnis von 1 : 1 : 3 : 3.

Quadruplett und Duplett haben die gleichen Kopplungskonstanten ($I = 5,5\text{ Hz}$), so daß hier vermutlich eine Methylgruppe in Nachbarschaft eines tertiären Kohlenstoffatoms vorliegt. Das Singulett bei 7,27 ppm (T) dürfte einer isoliert stehenden Methylgruppe zuzu-

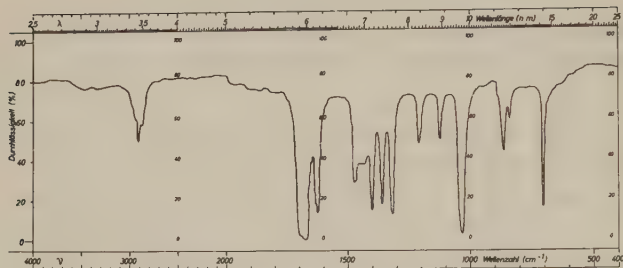


Abb. 6 Infrarot-Spektrum des Gyromitrins

ordnen sein, während das zweite Singulett bei 1,67 ppm (**T**) als Proton einer N-Formylgruppe interpretiert wurde. Für diese Annahme sprachen vor allem die Ergebnisse des Infrarot-Spektrums sowie der Vergleich mit dem MNR-Spektrum des Dimethylformamids, bei dem das Signal des Formylprotons bei 1,98 ppm (**T**) liegt.

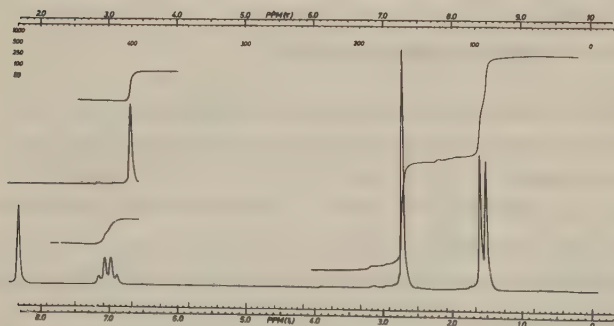
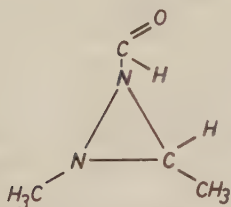
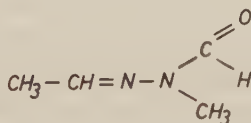


Abb. 7 Kernresonanz-Spektrum des Gyromitrins

Diese Analysenergebnisse beschränken die Zahl der möglichen Strukturen auf zwei, nämlich die eines trisubstituierten Diaziridins (1-Formyl-2,3-dimethyl-diaziridin) und auf die eines Hydrazons (N,N-Methylformylacetaldehydhydrazon).



(1)



(2)

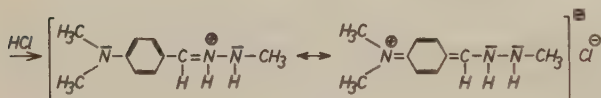
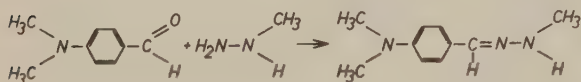
Beide Stoffe müßten zu Acetaldehyd und Methylhydrazin hydrolysieren. Im Hydrolysat müßte Ameisensäure nachweisbar sein.

2.2.06 Nachweis von Methylhydrazin und Ameisensäure

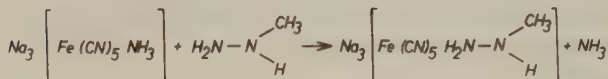
Die weitere Prüfung bestätigte diesen Befund. Bei der sauren Hydrolyse entstand Methylhydrazin, das elektrophoretisch nachgewiesen wurde. Das langgesuchte, Kaliumpermanganatlösung reduzierende "Amin" war damit aufgefunden.

Die chemische Prüfung auf Methylhydrazin wurde wegen der geringen Menge der zur Verfügung stehenden Substanz mit Tüpfelreaktionen durchgeführt. So bildete sich beim Erwärmen von Gyromitrin mit einer sauren Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd und Tüpfeln der erkalteten Lösung auf Filtrierpapier ein rosa Fleck,

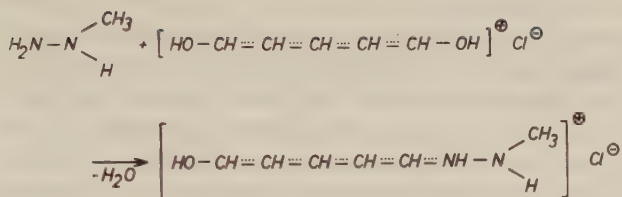
der im UV-Licht lachsfarben fluoreszierte. Dieser empfindliche Hydrazinnachweis beruht auf der Bildung von p-Dimethylaminobenzaldehydmethylhydrazon, das sich in saurer Lösung in das chinoide, nicht fluoreszierende Kation umlagert. Dieses bildet wahrscheinlich Adsorbate an die sauren Bestandteile des Papiers, die die Färbung und die Fluoreszenz bewirken (37).



Zu einem weiteren Hydrazinnachweis wurde wenig Gyromitrin alkalisch hydrolysiert und nach Neutralisation mit einer Lösung von Natriumpentacyanoamminoferrat (II) versetzt. Die Mischung färbte sich tief rot. Vermutlich wird bei dieser Reaktion der Ammoniak im Cyanidkomplex durch das Hydrazin ausgetauscht (38).



Glutaconaldehyd bildet mit Hydrazinen in stark saurer Lösung intensiv gefärbte Polymethinfarbstoffe (39):



Wurden Spuren von Gyromitrin mit dem Reagens getüpfelt, so entstand eine tief blutrote Farbe.

Die Formylgruppe des Giftstoffes konnte durch alkalische Hydrolyse zu Ameisensäure nachgewiesen werden. Diese wurde von naszierendem Wasserstoff (Magnesium und Salzsäure) zu Formaldehyd reduziert, der positiven Ausfall der Chromotropsäurereaktion bewirkte.

Der bei der sauren Hydrolyse entstehende Acetaldehyd war früher schon untersucht worden.

2.2.07 Konstitution des Gyromitrins

Die Entscheidung, welche der beiden Strukturformeln dem Gyromitrin zukommt, ergibt sich aus den unterschiedlichen chemischen Eigenschaften. Diaziridine werden nur sehr langsam von Säuren, oft erst nach mehrtägigem Stehen bei Zimmertemperatur angegriffen. Sie bilden mit Säuren Salze, aus denen die Base durch Alkali unversehrt wieder freigesetzt werden kann (SCHMITZ und HABISCH (40)). Der Giftstoff dagegen wird sehr leicht von Säuren angegriffen und ist keinesfalls beständig gegen Alkali. Außerdem ist er ein Reduktionsmittel und empfindlich gegen

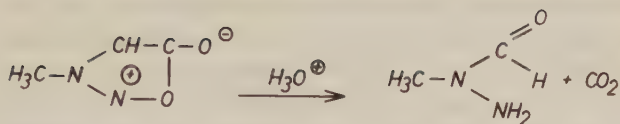
Sauerstoff, während die Diaziridine als Oxydationsmittel in saurer Lösung Jodid zu Jod zu oxydieren vermögen. Diese Argumente sprechen sehr für die Konstitution eines Hydrazons, zumal die Verbindung (1) ein asymmetrisches Kohlenstoffatom enthält und somit optisch aktiv sein müßte. Es konnte jedoch bei Gyromitrin keine optische Drehung beobachtet werden. Der Giftstoff der Frühjahrslorchel hat daher die Struktur eines N,N-Methylformylhydrazons des Acetaldehyds. Die Synthese bestätigte diesen Befund.

2.3 SYNTHESE DES GYROMITRINS

Zur Synthese des Gyromitrins erschienen zwei Wege sinnvoll. Es konnte erstens das Acetaldehydmethylhydrazon hergestellt und formyliert werden oder aber zweitens Methylhydrazin zu N,N-Methylformylhydrazin acyliert und mit Acetaldehyd umgesetzt werden.

Das nach einer Vorschrift von MUELLER und RUNDEL (41) zunächst hergestellte Methylhydrazon des Acetaldehyds reagierte jedoch mit Ameisenester nicht. Erst die Behandlung mit Ameisensäure-essigsäureanhydrid (HUFFMANN (42)) ergab das gesuchte Formylderivat. Die Isolierung des Gyromitrins aus dem Reaktionsgemisch gestaltete sich aber wegen der leichten Zersetzlichkeit des Pilzgiftes so schwierig, daß das Verfahren aufgegeben werden mußte.

Daher wurde nunmehr versucht, durch Spaltung von 3-Methyl-sydnon (HAMMICK und VOADEN (43)) mit äquivalenten Mengen Wasser und Chlorwasserstoff (KENNER und MACKAY (44)) N,N-Formylmethylhydrazin darzustellen:



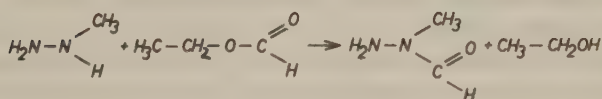
Trotz genauer Einhaltung der allerdings recht spärlichen Angaben der Autoren sowie vieler Variationen der Versuchsbedingungen gelang es nicht, das gesuchte Präparat zu synthetisieren.

Bei den anderen gebräuchlichen Acylierungsmethoden zur Darstellung von N,N-Alkyl-acylhydrazinen aus Monoalkylhydrazinen entstehen regelmäßig in kleineren oder größeren Mengen auch die isomeren N,N'-Alkyl-acylhydrazine, obwohl der alkylierte Stickstoff durch seine stärkere Basizität bevorzugt reagieren müßte. Vermutlich ist dieses Verhalten sterisch bedingt. Dieser Einfluß dürfte jedoch bei der Einführung der kleinen Formylgruppe entfallen, und somit sollte bei der Acylierung von Methylhydrazin mit Ameisensäureester nur das N,N-Methylformylhydrazin entstehen. Diese Überlegung wurde durch eine Arbeit von PEDERSEN (45) bestätigt, der bei der genannten Umsetzung fast nur N,N-Alkyl-formylhydrazin erhielt.

Die Arbeitsweise von PEDERSEN hatte den Nachteil, daß durch die angewendeten hohen Temperaturen ein tief gelbbraun gefärbtes Präparat entstand, das nur durch Gaschromatographie gereinigt werden konnte. Für die Synthese des Gyromitrins wurde daher das N,N-Methylformylhydrazin durch Umsetzung von Methylhydrazin mit einer äthanolischen Lösung von Ameisensäureäthylester bei -15°C vorgenommen. Nach Entfernung des Lösungsmittels und der nicht umgesetzten

Ausgangsstoffe am Rotationsverdampfer blieb in 85%iger Ausbeute reines farbloses N,N-Methylformylhydrazin zurück. Dieses wurde ebenfalls bei -15°C mit der äquivalenten Menge frisch destillierten Acetaldehyds, gelöst in Äther, versetzt. Das entstehende Wasser wurde anschließend durch Rühren mit getrocknetem Natriumsulfat bei Zimmertemperatur aus dem Reaktionsgemisch entfernt.

Nach Abdampfen des Äthers wurde das entstandene Gyromitrin schichtchromatographisch gereinigt und mittels der bei der Isolierung des natürlichen Giftstoffes verwendeten Apparatur destilliert und in Ampullen eingeschmolzen.



Das Syntheseprodukt erwies sich durch Vergleich des IR-Spektrums, des Schmelzpunktes, der Kristallform und des dünnstschichtchromatographischen Verhaltens mit den aus den Pilzen isolierten Gift identisch.

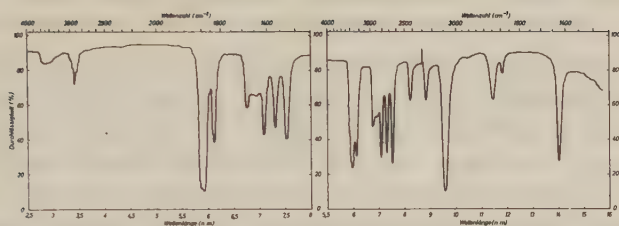


Abb. 8 IR-Spektrum des synthetischen Gyromitrins

2.4 UNTERSUCHUNGEN AM FRISCHPILZ

2.4.01 Prüfung auf Gyromitrin und andere Hydrazinderivate

Kurze Zeit nach der Strukturaufklärung des Gyromitrins konnten in der Nähe von Marburg, im Burgwald, zwei kleinere Standorte von *Gyromitra esculenta* auffindig gemacht werden. Das war umso bedeutsamer, als im Frühjahr 1967, bedingt durch die schlechte Witterung, die gesamte Lorchelernte in der Lüneburger Heide ausgefallen war. Mir stand daher für die Untersuchung der Frischpilze nur wenig Material zur Verfügung.

Immerhin konnte an den frisch gepflückten Frühjahrsorcheln geprüft werden, ob sie den aus der alkoholischen Tinktur isolierten Giftstoff enthielten. Schließlich interessierte, ob der Pilz noch andere Hydrazinderivate synthetisierte. Ich hatte den Hydrazinnachweis nach OFRI und ANGER mit Glutaconaldehyd (39) zu einem Sprühreagens für die Dünnschichtchromatographie modifiziert und festgestellt, daß das Ätherperforat I außer Gyromitrin noch mindestens

acht weitere Hydrazine enthielt. Die Frage war, ob diese Stoffe genuin im Pilz vorkommen, oder ob es sich um Abbauprodukte handelte.

Da Gyromitrin recht flüchtig ist und mit Wasser zusammen verdampft, sollte es durch Gefriertrocknen der frischen Lorcheln und Auffangen des Sublimats quantitativ zu gewinnen sein. Die erhaltene wäßrige Lösung hätte dann direkt zur Gehaltsbestimmung verwendet werden können. Doch die Lyophilisationsversuche zeigten, daß das Kondensat weder Gyromitrin (geprüft mit Glutaconaldehyd), noch Acetaldehyd (geprüft mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin) enthielt. Immerhin war jedoch der Pilz auf schonende Weise vom Wasser befreit worden.

Ich untersuchte nun, ob der Giftstoff mit Lösungsmittel aus den trockenen Lorcheln zu extrahieren sei. Zu diesem Zweck wurden sie in einem Vakuumexsikkator über Blaugel 48 Stunden nachgetrocknet und anschließend im Soxhlet-Extraktor mit frisch destilliertem, peroxidfreiem Äther extrahiert. Im Extrakt ließen sich auch diesmal weder Gyromitrin noch Acetaldehyd nachweisen.

Bei einer weiteren Charge Frühjahrsorcheln, die lyophilisiert wurden, unterblieb aus Zeitmangel die Nach Trocknung. Jetzt fiel die Prüfung des Ätherextraktes auf Gyromitrin und Acetaldehyd plötzlich stark positiv aus. Auch dünnschichtchromatographisch konnte nunmehr Gyromitrin nachgewiesen werden sowie elektrophoretisch das bei der alkalischen Hydrolyse entstehende Methylhydrazin. Ergänzende Versuche ergaben, daß der Giftstoff nur bei unvollkommener Trocknung oder mit wassergesättigtem Äther aus den lyophilisierten Lorcheln extrahiert werden konnte.

So war auch im Preßsaft von Frischpilzen weder Gyromitrin noch Acetaldehyd nachzuweisen. Der Preßrückstand dagegen färbte sich mit Glutaconaldehyd leuchtend rot. Vermutlich hängt damit zusammen, daß sich

im gesamten Schrifttum über die *Gyromitra esculenta* kein Hinweis über eine Untersuchung der Toxizität des Pilzpreßsaftes befindet. Es wurde immer nur mit Decothen und alkoholischen Auszügen gearbeitet. Daher ist zu vermuten, daß der Lorchelsaft gar nicht giftig ist. Leider konnte wegen Mangel an Frischpilzen der Beweis nicht erbracht werden.

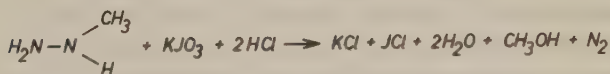
Das Dünnschichtchromatogramm des Ätherextraktes enthielt neben Gyromitrin nur noch ein einziges Hydrazinderivat bei $R_f = 0,3$, das in der Lorcheltinktur und in den anderen Aufarbeitungen fehlte. Die vielen anderen Hydrazinderivate in dem Ätherperforat I erwiesen sich somit als Artefacte, entstanden durch die lange Lagerung. Dies wurde auch durch die Tatsache erhärtet, daß Frischpilze, die nur 14 Tage mit Äthanol mazeriert wurden, ebenfalls nur zwei Hydrazinabkömmlinge, Gyromitrin und Stoff $R_f = 0,3$ enthielten.

Die Isolierung und Identifizierung des unbekannten Hydrazins konnte wegen Mangel an frischem Pilz nicht in Angriff genommen werden. Vermutlich handelt es sich um ein Abbauprodukt des Gyromitrins. Es hat den gleichen R_f -Wert wie N,N-Methylformylhydrazin.

2.4.02 Gehaltsbestimmung

Zur Gehaltsbestimmung des Gyromitrins aus dem Ätherextrakt der gefriergetrockneten Pilze standen drei Methoden zur Auswahl: 1. Bestimmung des bei der Hydrolyse entstehenden Methylhydrazins, 2. Bestimmung des bei der Behandlung mit Säuren entstehenden Acetaldehyds und 3. Ermittlung der bei der alkalischen Hydrolyse entstehenden Ameisensäure, die jedoch aus technischen Gründen ausschied.

Der Gehalt an Methylhydrazin wurde nach einem Verfahren von KOLTHOFF (46) zur Bestimmung von Hydrazin ermittelt. Mc KENNIS und YARD (47) haben diese Arbeitsweise auf Methylhydrazin angewandt und gute Ergebnisse erzielt. Das Prinzip besteht in der quantitativen Oxydation von Methylhydrazin durch Kaliumjodat in starker Salzsäure:



Eine gemessene Menge Ätherextrakt wurde zweimal mit 1 n HCl ausgeschüttelt (Versuche hatten gezeigt, daß schon bei der ersten Ausschüttelung praktisch alles Gyromitrin als Methylhydrazin in die wäßrige Phase ging) und die vereinigten Auszüge am Rotationsverdampfer zur Entfernung von Äther, Acetaldehyd und Ameisensäure bis fast zur Trockne eingedampft. Nach Zusatz von 50 ml 5 n Salzsäure wurde die Lösung mit 0,1 n Kaliumjodatlösung titriert (Amaranth als Indikator). Die erhaltenen Werte sind in der Tabelle auf der folgenden Seite aufgezeichnet.

Bei Versuch Nr. 5 wurde die oben beschriebene, durch 14tägige Mazeration mit Äthanol erhaltene Lorcheltinktur untersucht. Hierbei wurde eine gemessene Menge der Tinktur mit 10 ml 1 n Salzsäure versetzt, fast bis zur Trockne eingedampft und dann das Methylhydrazin, wie bei dem Ätherextrakt beschrieben, bestimmt.

Jede Zahl stellt den Mittelwert aus mindestens drei Bestimmungen dar. Die Gyromitrinwerte gelten natürlich unter dem Vorbehalt, daß außer diesem Giftstoff im Pilz keine anderen Hydrazinderivate genuin vorliegen.

Charge Nr.	Frischpilz- menge (g)	Gehalt an Me- thylhydrazin (mg)	Berechnet als Gyromitrin (mg)	Gehalt an Me- thylhydrazin pro kg Frisch- pilz (mg)	Berechnet als Gyromitrin pro kg Frischpilz (mg)
1	41,5	23,6	51,8	577	1248
2	66,0	44,6	98,0	677	1484
3	51,7	31,8	69,8	615	1350
4	61,8	47,5	103,5	762	1676
5	41,0	23,5	51,8	576	1247

Tabelle: Ergebnisse der Analyse von Frischpilzen

Wenn der Gehalt an Acetaldehyd in der Frühljarslorchel dem Methylhydrazingehalt äquimolar wäre, würde auch die Wahrscheinlichkeit, daß das Gyromitrin der genuine Giftstoff ist, sehr groß sein. Außerdem würde die Gehaltsbestimmung nach der Kaliumjodat-Methode bestätigt.

Daher wurde zunächst versucht, den Acetaldehydgehalt nach einem von LOHMANN (48) ausgearbeiteten Verfahren zu ermitteln. Hierbei wurde der Acetaldehyd in das 2,4-Dinitrophenylhydrazon überführt und mit Benzin aus dem Reaktionsgemisch ausgeschüttelt. Die Extinktion der gelben Lösung konnte spektralphotometrisch bei 340 nm gegen Benzin gemessen werden. Die erhaltenen Werte waren jedoch viel zu niedrig. Sie betrugen etwa 5% der bei der Kaliumjodat-Titration erzielten. Auch der Versuch, aus zerkleinerten Frischpilzen durch Ansäuern mit Orthophosphorsäure und anschließende Wasserdampfdestillation den aus dem Giftstoff entstehenden Acetaldehyd zu gewinnen, mißlang. Es ging kein Aldehyd über. Wahrscheinlich zersetzt sich das sehr reaktionsfähige Gyromitrin unter den Bedingungen der Versuche auf bisher unbekannte Weise.

Doch die Werte der Kaliumjodat-Titration geben zumindest den Gehalt des Pilzes an Methylhydrazin an, und dieser Stoff ist wahrscheinlich allein für die toxische Wirkung der Lorchel verantwortlich.

3. DISKUSSION

Da Gyromitrin sehr leicht zu Methylhydrazin hydrolysiert, dürfte sich die toxische Wirkung der Frühjahrs-orchel von der des Hydrazinderivats nicht erheblich unterscheiden, denn die anderen beiden Spaltprodukte, Acetaldehyd und Ameisensäure, sind in den in Frage kommenden Mengen völlig ungiftig. Glücklicherweise sind in neuerer Zeit die Methylderivate des Hydrazins aufgrund ihrer Verwendung als Raketentreibstoffe und ihrer Verwandtschaft mit therapeutisch gebrauchten Monoaminoxidasehemmern pharmakologisch eingehend untersucht worden.

Tatsächlich ähneln sich die Symptome einer Orchelvergiftung und einer Intoxikation mit Methylhydrazin verblüffend. JACOBSON und Mitarbeiter (49) beobachteten beim Hund Erbrechen, starke Atembeschwerden, erhöhte Körpertemperatur, schwere tonisch-klonische Krämpfe und massive Hämolyse (Absturz der Hämoglobinwerte auf fast 60%, Erythrozyten von 6,7 auf 3,4 Mill.). Die Sektion zeigte Lungenödem und Blutungen in den Lungenflügeln. Die gleichen Erscheinungen sah BOSTROEM (12) bei seinen Versuchen mit Hunden. Merkwürdig ist jedoch, daß die von ihm als Hauptmerkmal der Orchelvergiftung festgestellte Hämoglobinurie von den amerikanischen Autoren gar nicht erwähnt wird. Es besteht aber kein Zweifel, daß bei der von ihnen beschriebenen schweren Hämolyse auch Blutfarbstoff in den Urin übergegangen sein muß.

Die Vorstellung von Methylhydrazin als dem wirksamen Prinzip in der Orchel wird weiterhin gestützt durch die Tatsache, daß von den verschiedenen Versuchstieren, die JACOBSON und Mitarbeiter verwendeten (Mäuse, Ratten, Goldhamster und Hunde) nur die Hunde mit Hämolyse reagierten. Die gleiche Eigentümlichkeit findet sich bekanntlich auch bei den Helvella-Vergiftungen.

Die Konstitution des Gyromitrins befriedigt somit auch in pharmakologischer Hinsicht. Doch noch andere

Erscheinungen lassen sich durch die Erkenntnis, daß das Lorchelgift ein Hydrazinderivat ist, erklären, so die nach dem Einatmen von Giftstoff eingetretenen Halluzinationen, die schon FRANKE beobachtet hatte. Hier zeigt sich, daß Methylhydrazin als kräftiger Monoaminoxidasehemmer (in vivo verursachen $5,0 \times 10^{-4}$ Mol/kg Ratte im Gehirn 72% und in der Leber 93% Hemmung (50)) schon in Spuren starke zentrale Wirksamkeit entfaltet. Auch die tonisch-klonischen Krämpfe im Vergiftungsbild der Frühjahrslorchel, die von den älteren Autoren als Folge der schweren Leberschädigung interpretiert wurden, erwiesen sich nunmehr als ein Ausdruck des direkten Einflusses auf das Gehirn durch Enzym-Hemmung. Schon STUHLFAUTH und JUNG (11) hatten übrigens auf die Wahrscheinlichkeit einer primären Wirkung auf das zentrale Nervensystem bei Intoxikationen mit der Lorchel hingewiesen.

Es lassen sich also die hämolytische und die zentrale Wirksamkeit des Pilzes an Hand des Gyromitrins, beziehungsweise seines Grundkörpers, des Methylhydrazins, erklären. Aber auch die von PICK (9) beschriebenen Augen- und Schleimhauterkrankungen, die auf lokale Einwirkung des Pilzgiftes bei den Arbeiterinnen in der sogenannten "Kaltwäsche" auftraten, passen zu der Vorstellung über die Struktur des Giftstoffes. Von Hydrazin und seinen Methylderivaten ist nämlich bekannt, daß sie Hornhaut und Konjunktivae angreifen (51).

Ebenfalls eindeutig beantworten läßt sich die Frage, ob die Frühjahrslorchel neben dem Gyromitrin noch andere Giftstoffe enthält. Das isolierte Gift zeigt alle Symptome einer Lorchelvergiftung, und es erscheint daher sehr unwahrscheinlich, daß in der Lorchel noch ein anderes Wirkungsprinzip als das Methylhydrazin enthalten ist.

Auch die chemischen Eigenschaften des Pilzes werden nun verständlich. Das von AYE (29) gefundene "flüchtige Alkaloid" ist vermutlich Methylhydrazin gewesen. Ebenso wird die REIFsche Reaktion (30) zur Unterscheidung zwischen Morcheln und Lorcheln auf Reduktion des Selendioxids zu elementarem Selen durch das Hydrazinderivat beruhen. Die vom gleichen Autor beschriebene, bei der Destillation des sauren Lorchelauszugs übergehende Substanz, die Fuchsinschweflige Säure rot färbte, muß Acetaldehyd gewesen sein.

Weiterhin ist bei der Sauerstoffempfindlichkeit des Gyromitrins leicht einzusehen, daß die Pilze beim Trocknen schnell ungiftig werden. Die Unschädlichkeit getrockneter Lorcheln beruht also auf der Oxydation des Hydrazons und nicht, wie früher angenommen, auf der Flüchtigkeit des Giftes. Zwar ist die Reinsubstanz sehr flüchtig, doch verbleibt das Gyromitrin praktisch quantitativ im getrockneten Pilz, wie die Gefriertrocknungsversuche zeigten.

Die Frage nach der Konstitution des zweiten Hydrazinabkömmlings, der in der frischen Frühjahrsorchel gefunden wurde, steht noch offen.

Bisher ist nur ein Hydrazinderivat das Agaritin (γ -Glutamyl-p-hydroxy-methyl-phenylhydrazin) aus *Agaricus bisporus* (Lge) Imbach (KELLY 1962 (52)) in der belebten Natur gefunden worden. Die Biosynthese von Hydrazinen ist m.W. noch ungeklärt.

Lorchelvergiftungen konnten bislang nur symptomatisch behandelt werden. Im Vordergrund der ärztlichen Maßnahmen standen Leberschutztherapie und Stützung des Kreislaufs. Durch die Erkenntnis, daß das Gift der Frühjahrsorchel ein Methylhydrazinderivat ist, zeichnet sich die Möglichkeit ab, diese lebensbedrohliche Vergiftung gezielt zu behandeln. 1964 fanden O'BRIEN und Mitarbeiter (53), daß bei Ratten die LD_{50} des Methylhydrazins (28 mg/kg), der mit Abstand gif-

tigsten Stoff unter den Methylderivaten des Hydrazins, durch gleichzeitige parenterale Gabe von $1,5 \times 10^{-4}$ Mol Pyridoxin verdoppelt werden kann. Schon 1963 hatte MEDINA (54) beobachtet, daß das Vitamin die Krämpfe von Ratten unterdrückt, denen Methylhydrazin verabreicht worden war. Paradoxe Weise wirkt Pyridoxal, von dem man annehmen sollte, daß es durch seine Aldehydgruppe infolge Hydrazonbildung bevorzugt das Methylhydrazin inaktiviert, nicht als Antidot. Jedoch fanden WEIR und Mitarbeiter (55) p-Dimethylaminobenzaldehyd und Aminoglykolsäure als sehr geeignet.

Die mit Laboratoriumstieren gemachten Beobachtungen übertrug FRIERSON (56) 1965 auf den Menschen. Er hatte mehrere Arbeiter zu behandeln, die durch das Leckwerden einer Leitung erhebliche Mengen des Raketentreibstoffes Aerozine 50 einatmeten. Dieser besteht im wesentlichen aus Hydrazin und dem in seiner toxischen Wirkung dem Methylhydrazin sehr ähnlichen N,N-Dimethylhydrazin. Die Männer zeigten alle Symptome einer schweren Vergiftung: Erbrechen, starke Kopfschmerzen, Atembeschwerden. Außerdem stellte FRIERSON klonische Bewegungen und beiderseitiges Lungenödem fest. Nach Behandlung mit 600 mg Pyridoxinhydrochlorid (200 mg i.v. und 2 x 200 mg i.m.) verschwanden sämtliche Erscheinungen nach 8-10 Stunden.

Bei den genannten Versuchen wurde jedoch das Antidot fast gleichzeitig (O'BRIEN, MEDINA, WEIR) oder nach 1-2 Stunden (FRIERSON), also verhältnismäßig kurz nach der Einwirkung des Giftes, angewendet. Ob die Gabe von Pyridoxin nach der langen Latenzzeit der Frühjahrsorchel-Vergiftung noch wirksam ist, wird noch zu klären sein.

4. EXPERIMENTELLER TEIL

4.1 ISOLIERUNG DES GIFTSTOFFES

4.1.01 Ausgangsmaterial

Als Ausgangsmaterial standen mir jährlich etwa 50 kg in der Lüneburger Heide frisch nach dem Sammeln in Äthanol eingelegte Frühjahrsorcheln zur Verfügung. Jeweils 25 kg Frischpilze wurden in 25 Liter Alkohol (99%ig, mit 2% Petroläther vergällt) konserviert und in 50-Liter-Polyäthylenbehältern bei 0°C in einem Kühlraum gelagert. Die Lagerungsdauer von der Ernte bis zur Verwendung zu den Untersuchungen betrug durchschnittlich 1 Jahr.

4.1.02 Gewinnung der Pilztinktur

Ich arbeitete meistens einen ganzen Polyäthylenbehälter auf einmal auf. Die Flüssigkeit dekantierte ich von den eingelegten Orcheln und filtrierte sie durch einen Büchnertrichter. Als Filtrierhilfe diente mir eine 5 mm starke Schicht Hyflo-Super-Cel. Die Pilze selbst füllte ich ohne weitere Zerkleinerung in eine mit einem Leinentuch ausgeschlagene Presse und preßte sie bei einem Druck bis zu 400 atü aus. Den Preßrückstand verwarf ich. Ich filtrierte die ausgepreßte Flüssigkeit ebenfalls und vereinigte beide Filtrate. Zur Aufbewahrung dienten die Polyäthylenbehälter, die auch wieder bei 0°C im Kühlraum gelagert wurden.

Die Lorcheltinktur war dunkelgelb und klar, sie roch leicht nach Mäuseurin. 1 Liter Lorcheltinktur entsprach etwa 525 g Frischpilzen.

4.1.03 Gewinnung des Lorchelextrakts

In Anpassung an die vorhandenen Laborgeräte wurden pro Charge 15 Liter Lorcheltinktur aufgearbeitet. Lediglich für die ersten Versuche wurden kleinere Ansätze verwendet. Sie wurden aber in derselben Apparatur unter den gleichen Bedingungen vom Alkohol befreit.

Die Destillationsvorrichtung wurde mit einer Wasserstrahlpumpe evakuiert und die Siedekapillare zur Vermeidung einer etwaigen Zersetzung des Giftstoffes durch den Sauerstoff der Luft an einen Ballon mit Stickstoff angeschlossen. Als Heizung diente ein 45°C warmes, thermostatisiertes Wasserbad. Es wurde so lange destilliert (ca. 3 Tage), bis der Rückstand 2 Liter betrug. 1 Liter Extrakt entsprach ca. 3,9 kg Frischpilzen.

Lediglich für die ersten Tierversuche stellte ich konzentriertere Auszüge her: Für die Tierversuche 1, 2 und 3 (Kaninchen, Maus, Ratte) wurden 5 Liter Lorcheltinktur auf 180 ml eingeengt und für Tierversuch 4 (Meerschweinchen) 10 Liter auf 1000 ml.

Der Extrakt stellte eine schmutzigbraune, trübe Flüssigkeit von hefeartigem, fäkalischem Geruch dar. Der pH-Wert betrug 4,4, gemessen mit der Glaselektrode.

4.1.04 Tierversuch 1

Ein männliches Kaninchen von 2,2 kg Gewicht erhielt am 1. Versuchstag um 11.20 Uhr 45 ml Lorchelextrakt, entsprechend 660 g Frischpilzen, in einer Portion per Schlundsonde.

Den Rest des Tages verhielt sich das Tier normal, verweigerte jedoch Futter- und Wasseraufnahme. Am

Morgen des 2. Tages zeigten sich gelbe Verfärbung der Skleren und Konjunktivae, sowie zunehmender Kräfteverfall. Das Tier saß apathisch in einer Ecke des Käfigs, es atmete unregelmäßig und zitterte. Um 10.20 Uhr wurde blutig-roter Urin gelassen (Pyramidonprobe positiv, Benzidinprobe positiv, Heglostix positiv), und die Atmung ging langsam und stoßweise. Das Tier wurde immer schwächer. 16.00 Uhr schwerste Atemnot, Atem entweicht pfeifend, das Kaninchen ist so kraftlos, daß es nur noch mit großer Anstrengung der Kopf hochhalten kann. 20.00 Uhr Atmung unverändert mühsam. Das Tier kann sich nicht mehr aufrichten. Ab 23.35 Uhr Lähmung der Hinterläufe, Atmung fast stillstehend. Um 3.35 Uhr setzten schwere tonisch-klonische Krämpfe ein, die jeweils 60-120 Sekunden anhielten. 4.05 Uhr Exitus.

Sektionsbefund (makroskopisch): Gefäße stark blutgefüllt, Leber gelb, brüchig, stark vergrößert. Magen und Darm ohne Blut, wenig Exsudat, Lunge blutig rot, massives Ödem, Nieren beim Durchschneiden blutig rot.

4.1.05 Tierversuch 2

Einer weiblichen Maus von 21 g Gewicht wurden 0,9 ml Extrakt, entsprechend 13,2 g Frischpilzen, intraperitoneal injiziert. Das Tier nahm keinerlei Schaden und lebte noch 4 Wochen nach Versuchsbeginn.

4.1.06 Tierversuch 3

Einer männlichen Wistar-Ratte von 400 g Gewicht wurden per Schlundsonde 10 ml Extrakt verabreicht. Das entsprach 146 g Frischpilzen. Auch hier konnten

keine Anzeichen einer Erkrankung festgestellt werden.

4.1.07 Tierversuche 4 und 4a

Ein weibliches Meerschweinchen von 352 g Gewicht erhielt per Schlundsonde 20 ml Extrakt, entsprechend 105 g Frischpilzen.

Das Tier verhielt sich am ersten Tag nach der Fütterung normal. Erst nach etwa 24 Stunden saß es mit gestäubten Kopfhaaren lethargisch in einer Ecke des Käfigs; Fluchtreflex negativ. Es starb 78 Stunden nach Beginn des Versuchs ohne Zeichen des vom Kaninchen her bekannten schweren Krankheitsbildes mit Krämpfen und Lähmung. Hämoglobinurie konnte nicht beobachtet werden. Das Tier wurde nicht sezziert.

Ein weibliches Meerschweinchen von 360 g Gewicht erhielt 16 ml Extrakt per Schlundsonde appliziert, entsprechend 84 g Frischpilzen.

Auch dieses Tier zeigte außer Apathie, gestäubten Kopfhaaren und Fehlen des Fluchtreflexes keine auffallenden Vergiftungssymptome. Es starb 45 Stunden nach der Fütterung. Die Sektion ergab (makroskopisch): Leber und Niere unverändert, Lungenentzündung, Lungenödem.

4.1.08 Ätherperforat I

In einem Jenaer Glas Universal - Extraktor 200 V/ 2000 ml, geschaltet für Extraktionsmittel mit geringerer Dichte als das Extraktionsgut, füllte ich 2 Liter Lorchelextrakt und perforierte 3 Tage lang mit

frisch destilliertem, peroxidfreiem Äther. Das Lösungsmittel in der Vorlage erneuerte ich täglich. Die vereinigten Perforate wurden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und anschließend am Rotationsverdampfer auf etwa 500 ml eingeengt.

Das Ätherperforat I war eine schmutziggelbe, klare Lösung, die unangenehm nach Schweißfüßen und stark nach Mäuseurin roch. Die Flüssigkeit wurde stets im Kühlschrank bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Eine Charge Ätherperforat I entsprach etwa 7,9 kg Frischpilzen.

4.1.09 Tierversuch 5

Von 330 ml Ätherperforat I, entsprechend 5,3 kg Frischpilzen, entfernte ich den Äther am Rotationsverdampfer. Durch Einblasen von Helium vertrieb ich die letzten Ätherspuren. Der Rückstand, 27 ml einer trüben gelbbraunen öligen Masse roch betäubend nach Mäuseurin und Schweißfüßen. Die Flüssigkeit reagierte sauer (pH 3,5).

Ein weibliches Meerschweinchen von 375 g Gewicht erhielt um 10.30 Uhr 2,0 ml obigen Rückstandes, suspendiert in 2,0 ml Wasser, per Schlundsonde. Die verabreichte Menge entsprach 390 g Frischpilzen.

Eine halbe Stunde nach Versuchsbeginn zeigten sich die ersten Symptome einer Erkrankung. Das Tier saß schweratmend und zitternd mit gestäubten Kopfhaaren in einer Ecke des Käfigs. Fluchtreflex negativ. 30 Minuten später fiel es plötzlich in schwere, minutenlang andauernde Krämpfe. Cornealreflex kaum wahrnehmbar, Preyerreflex negativ. Vier Stunden nach der Fütterung lag das Tier bewegungslos auf der Seite, die Hinterbeine waren gelähmt, die Atmung flach, kaum wahrnehmbar. Exitus 16.20 Uhr, knapp 6 Stunden nach Versuchsbeginn.

4.1.10 Wäßriger Auszug

Eine Charge Ätherperforat I (500 ml) wurde mit 50 ml äthergesättigtem Wasser in einem 1000 ml-Scheide-
trichter 10 Minuten kräftig geschüttelt. Nach Abtren-
nen der wäßrigen Phase wurde dieser Vorgang neunmal
wiederholt. Es entstanden so etwa 500 ml Flüssigkeit,
aus der der restliche Äther am Rotationsverdampfer
entfernt wurde. Die Lösung war blaßgelb gefärbt. Sie
roch stechend und wenig nach Mäuseurin.

4.1.11 Tierversuch 6

Ein weibliches Meerschweinchen von 340 g Gewicht er-
hielt 15 ml des wäßrigen Auszuges, entsprechend 240 g
Frischpilzen. Die Fütterung erfolgte um 16 Uhr per
Schlundsonde.

Um 17.15 Uhr saß das Tier mit gesträubten Kopfhaaren
zitternd in einer Käfigecke; Fluchtreflex negativ.
17.45 Uhr schwere tonisch-klonische Krämpfe, aktive
Seitenlage. Cornealreflex nur noch schwach. 18.00 Uhr
beginnende Lähmung der Hinterbeine, Atmung mühsam,
passive Seitenlage. 23.00 Uhr Exitus.

Die Sektion ergab makroskopisch: Lungenödem, örtliche
Blutungen der Magenwand, Leber mit gelblicher Läpp-
chenzeichnung.

4.1.12 Tierversuch 7

50 ml des mit Wasser ausgeschüttelten Ätherperforats
I wurden am Rotationsverdampfer von dem Äther befreit
und der Rückstand in 14 ml Wasser suspendiert.

Ein weibliches Meerschweinchen von 375 g Gewicht erhielt diese Suspension per Schlundsonde. Das Tier zeigte keine Zeichen einer Erkrankung.

4.1.13 Ätherperforat II

500 ml (1 Charge) des wäßrigen Auszugs von Ätherperforat I wurden in einem Perforator 12 Stunden mit frisch destilliertem, peroxidfreiem Äther extrahiert. Das Perforat wurde mit Natriumsulfat getrocknet. Es entstand eine gelbe, klare Flüssigkeit, die nicht mehr so stark nach Mäuseurin und Schweißfüßen roch wie das Ätherperforat I.

4.1.14 Tierversuch 8

20 ml Ätherperforat II, entsprechend 500 g Frischpilzen, wurden am Rotationsverdampfer vom Äther befreit und der Rückstand in 5 ml Wasser suspendiert. Ein weibliches Meerschweinchen von 385 g Gewicht erhielt die Flüssigkeit um 11.30 Uhr per Schlundsonde.

Um 12.40 Uhr hockte das Tier zitternd und apathisch mit gesträubten Kopfhaaren in einer Ecke des Käfigs. Bei Berührung versuchte es nicht mehr zu fliehen.

13.15 Uhr starke tonisch-klonische Krämpfe, das Tier lag auf der Seite, schwere Atemnot. Am 2. Versuchstag 8.00 Uhr beginnende Lähmung. 16.30 Uhr Lähmung der Hinterbeine, passive Seitenlage. Da nach meiner Erfahrung in diesem Zustand mit baldigem Exitus zu rechnen war, wurde das Meerschweinchen getötet.

Die Sektion ergab (makroskopisch): Leber brüchig, gelb mit deutlicher Läppchenzeichnung, Blutgerinnsel unter

der Leber, Galle stark haselnußgroß, massives Lungen-
ödem, Milz ca. $\frac{1}{3}$ vergrößert, schwarzrot verfärbt.

4.1.15 Dünnschichtchromatographische Trennung von Ätherperforat I und II

Als Sorptionsmittel diente Kieselgel GF₂₅₄ zur Dünnschichtchromatographie nach E. STAHL der Merck AG, Darmstadt. Die Platten wurden mit dem Desaga-Streichgerät beschichtet und im Trockenschrank bei 105°C aktiviert. Entwickelt wurde in der zur besseren Sättigung mit Filtrierpapier ausgelegten Desaga-Chromatographierkammer. Als Laufmittel diente meist eine Mischung aus Methylenchlorid und Methanol (9 + 1). Die entwickelten Chromatogramme wurden durch Einstellen in eine mit Joddampf gesättigte Kammer sichtbar gemacht.

4.1.16 Gaschromatographie

Ich führte die Versuche mit einem präparativen Gaschromatographen Autoprep 700 (Varian-Aerograph) durch. Das Gerät arbeitete mit einem Wärmeleitfähigkeits-Detektor. Es besaß eine automatische Auffangvorrichtung für maximal 8 Fraktionen und einen mit Preßluft angetriebenen Autoinjektor, der Einspritzungen bis 1,5 ml erlaubte. Zur Kühlung der Auffanggläser diente ein wärmeisolierter Trog, in den, geregelt durch ein Kontaktthermometer, vom Laborkryostaten kaltes Methanol gepumpt wurde. Die tiefste erreichbare Temperatur betrug ca. -25°C. Ich benutzte nachgereinigten Wasserstoff als Trägergas, der Gasstrom betrug etwa 200 ml/Min. Für meine Versuche verwendete ich

20' x 3/8" Aluminiumsäulen. Als Trennflüssigkeiten enthielten sie 1.20% Polyäthylenglykol 20000 (Carbowax 20 M) auf Chromosorb W 60/80 mesh, 2,20% Silicongummi (SE 30) auf Chromosorb W 60/80 mesh und 3. 20% Wachs (Apiezon L) auf Chromosorb W 60/80 mesh.

Ich begann mit der Carbowax-Säule bei einer Säulentemperatur von 80°C. Hierbei erhielt ich eine große Zahl von peaks, deren Anzahl, Höhe und Retentionszeit mit jeder Einspritzung wechselten. Das waren sichere Anzeichen für eine im Gerät eingetretene Zersetzung. Ich erniedrigte also die Temperatur und erhielt bei einer Einstellung von: Säule 60°C, Injektor 65°, Detektor 135°C und Collector 35° reproduzierbare Gaschromatogramme mit drei peaks, außer dem Luftpeak. Die Retentionszeit t_r (t_r = Gesamtretentionszeit t_{dr} -Durchflußzeit t_d) (57) betrugen 1,15 Min., 12,0 Min. und 26,7 Min. Die den peaks entsprechenden Stoffe wurden getrennt aufgefangen und wie folgt identifiziert: peak 1 Äther (wurde am Geruch erkannt), peak 2 Äthanol (wurde am Geruch sowie durch Jodoformprobe identifiziert) und peak 3 Wasser (fiel durch sein tailing auf, wasserfreies Kupfersulfat färbte sich blau). Eine Injektion von Vergleichssubstanzen bestätigte dieses Ergebnis.

4.1.17 Gewinnung der Substanz für das Infrarot-Spektrum

Als Trennflüssigkeit verwendete ich Carbowax 20 M. Die Temperaturen waren die gleichen wie unter 4.1.16 beschrieben. Je Durchgang wurden mit dem Autoinjektor 1 ml Ätherperforat II eingespritzt, insgesamt 30 ml. Wenn auf dem Schreiber der den Stoff 382 enthaltene peak 3 erschien, wurde der Ausgang des Autoprep mit einem tief gekühlten Kolben, der 10 ml CCl_4 enthielt, so verbunden, daß das Gas durch die Flüssigkeit perl-

te. Die Lösung wurde mit Natriumsulfat getrocknet.

4.1.18 Vakuumdestillation des Ätherperforats II

250 ml Ätherperforat II wurden am Rotationsverdampfer vom Äther befreit. Es entstanden etwa 0,5 ml einer braunen, öligen Flüssigkeit. Sie wurde vorsichtig durch die Kapillare in das Destillationsgefäß des Mikrovakuumdestillationsapparates nach PREGL gesaugt. Ich evakuierte mit der Wasserstrahlpumpe und erwärmte das Wasserbad langsam bis auf ca. 80°C. Es gingen einige Tropfen farbloses Destillat über. Das meiste konnte als Äthanol identifiziert werden, in dem eine saure, unangenehm nach Schweiß riechende Substanz gelöst war, die nicht näher untersucht wurde. Im Dünnschichtchromatogramm konnte der Stoff 382 nicht entdeckt werden. Aber auch in dem Destillationsrückstand waren nur noch Spuren der gesuchten Substanz zu finden. Sie mußte sich zersetzt haben.

4.1.19 Säulenchromatographie

Ein Chromatographierohr von 50 cm Länge und 2,5 cm Durchmesser wurde gleichmäßig mit in trockenem, peroxidfreiem Äther aufgeschlemmtem Kieselgel 0,05-0,2mm reinst für die Chromatographie "Merck" bis 10 cm unter den oberen Rand gefüllt und etwa 30 Min. mit einer Abtropfgeschwindigkeit von 4 ml/Min. mit Äther äquilibriert. Anschließend chromatographierte ich den vom Äther befreiten Rückstand einer Charge Ätherperforat II mit der gleichen Durchflußgeschwindigkeit. Das Eluat fing ich in Fraktionen zu je 10 ml auf, die sofort an Dünnschichtplatten rechromatographiert wurden. Identische Fraktionen wurden vereinigt.

4.1.20 Tierversuch 9

50 ml der durch Säulenchromatographie gewonnenen Flüssigkeit wurden am Rotationsverdampfer vom Äther befreit. Es blieb wenig einer gelblichen, viskosen Flüssigkeit zurück, die kurz vor der Fütterung in 3 ml Wasser gelöst wurde. Dabei trat intensiver Geruch nach Acetaldehyd auf.

Ein weibliches Meerschweinchen von 380 g Gewicht erhielt diese Flüssigkeit um 14.45 Uhr per Schlundsonde. Schon 30 Min. später zeigten sich die ersten Vergiftungssymptome. Das Tier saß ungewöhnlich tief atmend und apathisch in einer Käfigecke; Fluchtreflex negativ. Beginnendes Muskelzittern. 15.40 Uhr schwerste, minutenlang andauernde tonisch-klonische Krämpfe; das Tier lag auf der Seite und wurde bei den plötzlich eintretenden Krampfanfällen in die Höhe und von einer Ecke des Käfigs in die andere geschleudert; die Streckkrämpfe schienen das Tier zu zerreißen. Dazwischen heftige, schnelle Laufbewegungen in Seitenlage, so daß der Torf des Käfigbodens in die Luft geschleudert wurde. Als die Krämpfe abebbten, schienen die Hinterbeine gelähmt, das Tier vollführte Manegebewegungen. 16.00 Uhr: Das Meerschweinchen lag bewegungslos auf der Seite. Muskelstarre, Atmung sehr langsam, stoßweise. Um 16.35 trat der Tod ein. Die Sektion ergab makroskopisch: Darmgefäße stark blutgefüllt, Lungenödem, Leber fleckig marmoriert.

4.1.21 Tierversuch 10

Ein weibliches Meerschweinchen wurde in einen an der Seite und am Deckel tubulierten Exsikkator gesetzt. Der Ausgang vom Deckel wurde mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden. Die langsam abgesaugte Luft mußte

über den Rückstand von 25 ml Äthereluat streichen und gelangte durch den Seitentubus in den Exsikkator, so daß das Tier den verdampfenden Giftstoff einatmen mußte. Es zeigte, bis auf ein Zusammenziehen der Augenlider zu einem schmalen Spalt, kein außergewöhnliches Verhalten. Da sich nach etwa 1 Std. die giftige Fraktion in eine braune Schmiere verwandelt hatte, die maggiartig roch, brach ich den Versuch ab. Ich setzte das Meerschweinchen zur Beobachtung in einen Extrakäfig. Es starb 6 1/2 Tage nach Versuchsbeginn. Die Sektion ergab makroskopisch: hämorrhagische Pneumonie, Brusthöhle voll Blut.

4.1.22 Gaschromatographie

Das mit Sikkon getrocknete, durch Chromatographie an einer Kieselgelsäule gewonnene Äthereluat wurde bei den folgenden Temperaturen gaschromatographiert: Säule 85°C, Injektor 85°C, Detektor 115°C. Als stationäre Phase verwendete ich Carbowax 20 M (Polyäthylenglycol 20 000). Ich erhielt außer dem Luft-peak 4 peaks mit den Retentionszeiten 1,1 Min., 3,4 Min., 5,4 Min. und 6,9 Min. Sie wurden wieder getrennt aufgefangen und konnten wie folgt identifiziert werden: peak 1 Äther, peak 2 Stoff 382, peak 3 unbekannt, peak 4 Äthanol. Durch das Trocknen mit Sikkon war also das Wasser restlos entfernt worden. Die quantitative Auswertung (Höhe x Halbwertsbreite) ergab: 86,9% Äther, 10,5% Äthanol, 1,4% unbekannte Substanz und 1,2% Stoff 382. Bei der unbekannten Substanz handelte es sich wahrscheinlich um ein Lösungsmittel. Trotz des Gehaltes von 1,2% gelang es mir wiederum nicht, nennenswerte Mengen an Giftstoff aufzufangen.

4.1.23 Vakuumdestillation

Von einer Charge Ätherperforat II (500 ml) wurde am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel entfernt. Den Rückstand, etwa 23 ml, überführte ich in einen 100-ml-Spitzkolben. Zur Vergrößerung der Oberfläche setzte ich so viel poröse Siedesteinchen hinzu, bis die ganze Flüssigkeit aufgesaugt war. Der Kolben wurde über eine Kältefalle und ein zwischen zwei weiteren Kältefallen angeschlossenes Hg-Manometer mit der Ölpumpe verbunden. Ich kühlte mit flüssigem Stickstoff. Bei einem Druck von 0,3 Torr sammelten sich innerhalb von 48 Std. in der Vorlage etwa 4 ml farblose Flüssigkeit (Zimmertemperatur) von saurem, schweißartigem Geruch. Das Dünnschichtchromatogramm zeigte einen sehr hohen Gehalt an Stoff 382. Die unangenehm riechende Substanz hatte einen R_f -Wert von 0,5.

4.1.24 Schichtchromatographie

Auf 40 x 20 cm große Glasplatten wurde eine Mischung aus 50 g Kieselgel für die präparative Schichtchromatographie "Merck" und 120 ml Wasser gegossen und durch Klopfen mit der Hand gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden zwei Tage an der Luft getrocknet und dann im Trockenschrank bei 105°C aktiviert. Ich trug das Destillat mit einer dünn ausgezogenen Pipette etwa 1 cm vom unteren Rand entfernt in einer Linie auf. Nach dem Entwickeln mit einer Mischung aus Methylenchlorid und Methanol (9 + 1) zeichnete ich unter UV-Licht die Zone des gesuchten Stoffes mit einer Nadel ein und kratzte das Kieselgel zwischen den Markierungen ab. Es wurde mit Äther eluiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer wieder entfernt. Ich erhielt diesmal eine fast farblose, ölige Flüssigkeit, die bei -10°C kristallinisch erstarrte.

4.1.25 Reindarstellung des Giftstoffes durch Destillation

Die Apparatur bestand aus 2 U-Rohren (U_1 und U_2), von denen eines mit 3 angeschmolzenen Ampullen versehen war. Als Verbindungen dienten NS 14,5 Schliffteile mit Hähnen ($H_1 - H_4$). Der Kugelschliff zwischen den beiden Rohren erlaubte es, diese leicht von der übrigen Apparatur zu trennen, was beim Abschmelzen der Glasampullen wichtig war. An Hahn 4 schloß sich über ein Hg-Manometer zwischen zwei in flüssigen Stickstoff tauchenden Kältefallen die Ölpumpe an.

Die nach der Schichtchromatographie anfallende ätherische Lösung des Giftstoffes wurde am Rotationsverdampfer bis auf wenige ml eingeengt, in einen 25-ml-Spitzkolben überführt und hier der restliche Äther auf die gleiche Weise entfernt. Den Rückstand versetzte ich zum Trocknen und zur Vergrößerung der Oberfläche unter Kühlen mit einigen Körnchen Sikkon. Das poröse Material hatte nach kurzer Zeit die Flüssigkeit aufgesaugt. Nun wurde das Kölbchen an das U-Rohr U_1 angeschlossen. Nach Schließen des Hahnes 1, bei geöffneten Hähnen 2-4, evakuierte ich die Apparatur. Dann wurde Hahn 1 vorsichtig geöffnet und U_1 mit Methanol-Kohlendioxid auf etwa -30°C gekühlt. In der Vorlage kondensierte bei einem Druck von ca. 0,2 Torr langsam eine wasserhelle Flüssigkeit. Nach etwa 10 Min. schloß ich Hahn 1 und entfernte die Kühlung von U_1 . Die Flüssigkeitsmenge verringerte sich zusehends unter Zurücklassung von langen, schmalen, weißen Kristallen. Jetzt wurde schnell wieder gekühlt und Hahn 1 geöffnet. Die erhaltenen Kristalle wirkten vermutlich als Impfkristalle, denn langsam bedeckte sich nun die Innenseite des mit dem Spitzkolben verbundenen Schenkels mit einem Netz von langen, schmalen Kristallen, während sich am Boden des U-Rohres wieder Flüssigkeit ansammelte. Als sich keine

neuen Kristalle mehr bildeten, also aller Giftstoff aus dem Spitzkolben in das U-Rohr übergegangen war, wurden durch mehrmaligen Wechsel zwischen Kühlen und Entfernung der Kühlung auch die letzten Flüssigkeitsreste entfernt. Zur weiteren Rektifizierung wurde das Verfahren mit U-Rohr U_2 als Vorlage wiederholt. Dazu wurde die Kühlung von U_1 entfernt und U_2 gekühlt. Bei dieser zweiten Stufe kondensierte nur noch wenig Flüssigkeit. Auch hier war bald die ganze Innenseite des mit dem U-Rohr U_1 verbundenen Schenkels mit einem Netz von Kristallen bedeckt. Nachdem der Inhalt von U_1 verdampft war, wurde Hahn 3 geschlossen und die Kühlung entfernt. Nach Vertreiben des Äthanol wurde auch Hahn 4 geschlossen und die Kristalle vorsichtig durch Erwärmen mit der Hand geschmolzen. Durch Schrägstellen des U-Rohres verteilte ich die entstandene Flüssigkeit möglichst gleichmäßig in die drei Ampullen, die anschließend abgeschmolzen wurden. Auf diese Weise konnte ich etwa 150 mg reinen Giftstoff gewinnen.

4.1.26 Schnellverfahren zur Isolierung des Giftstoffes aus der Lorcheltinktur

Von 5 l Lorcheltinktur wurde das Äthanol in der unter 4.1.03 beschriebenen Weise abdestilliert. Wenn aller Alkohol übergegangen war, was man sehr schön im Kühler an der erhöhten Oberflächenspannung der kondensierenden Flüssigkeit sehen konnte, wurde das Destillat in 500 ml-Portionen mit Äther perforiert. Die mit Natriumsulfat getrockneten Ätherperforate vereinigte ich und engte sie am Rotationsverdampfer bis auf wenige ml ein. Nach Trocknen mit Sikkon und Entfernen des restlichen Äthers erhielt ich so einen Rückstand, der aus fast reinem Giftstoff bestand. Der Giftstoff wurde,

wie die auf anderem Wege gewonnenen Fraktionen, durch Verdampfen im Feinvakuum analysenrein isoliert.

4.1.27 Tierversuch 11

Ein weibliches Meerschweinchen von 375 g Gewicht erhielt um 14.45 Uhr ca. 50 mg reinen Giftstoff, kurz vor Verabreichung in 2 ml Wasser gelöst, per Schlundsonde. Ab 15.30 Uhr war der Fluchtreflex negativ. Das Tier saß teilnahmslos in einer Ecke des Käfigs. 16.15 Uhr passive Seitenlage, das Meerschweinchen zitterte, Atmung mühsam, verlangsamt. Um 16.30 Uhr setzten schwere tonisch-klonische Krämpfe ein. Das Tier lag zwischen den Krampfanfällen auf der Seite, Cornealreflex kaum wahrnehmbar, Preyer-Reflex negativ. Nach Abklingen der Krämpfe heftige krampfhaft Gehbewegungen, ebenfalls in Seitenlage. Gegen 17.00 Uhr wurde das Tier zusehends schwächer, beginnende Muskelstarre. Exitus zwischen 17.00 und 18.00 Uhr.

Die Sektion ergab makroskopisch: Blutgefäße stark blutgefüllt, Lunge mit leichtem Emphysem, Leber blutgefüllt, Gallenblase vergrößert.

4.2 STRUKTURAUFKLÄRUNG DES GYROMITRINS

4.2.01 Qualitative Elementaranalyse (58)

Durch Erhitzen von etwa 5 mg Gyromitrin mit Kalium und Überführen des Reaktionsgemisches in Wasser wurde eine Aufschlußlösung hergestellt, die auf folgende Elemente geprüft wurde:

1. Stickstoff: LASSAIGNE-Probe positiv

2. Schwefel: Probe mit Natriumnitrosylpentacyanoferrat (II) negativ
3. Halogene: Probe mit Silbernitrat negativ.

4.2.02.1 Identifizierung des als Bruchstück des Gyromitrins entstehenden Acetaldehyds

Etwa 2,5 mg Gyromitrin wurden in wenig Wasser gelöst und mit 1 ml 2,4-Dinitrophenylhydraziniumperchloratlösung nach ORGANICUM (59) versetzt (1,2 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin werden in 50 ml 30%iger Perchlorsäure gelöst). Der Niederschlag wurde mit Wasser gewaschen und zweimal aus Äthanol umkristallisiert. Schmelzpunkt 150°C .

Zum dünnschichtchromatographischen Vergleich wurde aus frischdestilliertem Acetaldehyd ebenfalls durch Füllen mit 2,4-Dinitrophenylhydraziniumlösung das Hydrazon hergestellt. Die Chromatogramme wurden auf Kieselgel G mit Tetrachlorkohlenstoff, Essigester und Hexan (100 : 10 : 20) nach MEHLITZ und Mitarbeiter (60) entwickelt. Beide Stoffe hatten den gleichen R_f -Wert.

4.2.02.2 Alkalische Hydrolyse, Isonitrilreaktion, Elektrophorese

Ein Tropfen Gyromitrin, ca. 5 mg, wurde in wenig Wasser gelöst, mit einem Tropfen 0,1 n NaOH versetzt und 10 Minuten in ein Wasserbad von $80-90^{\circ}\text{C}$ gestellt. Dabei trat Geruch nach Amin auf. Nach dem Abkühlen säuerte ich die Lösung mit verdünnter Essigsäure an und konzentrierte sie am Rotationsverdampfer auf ca. 0,5 ml.

Ein Teil der Lösung wurde in 1 ml Äthanol gelöst und mit 2 ml verdünnter Natronlauge sowie einigen Tropfen Chloroform gekocht. Es entstand ein unangenehmer, isonitrilartiger Geruch (61).

Der Rest des alkalischen Hydrolysats wurde papier-elektrophoretisch untersucht. Als Gerät benutzte ich einen Pherograph Original Frankfurt nach Wieland-Pfleiderer. Die Pherogramme wurden auf MN-Chromatographiepapier 2827 (Macherey, Nagel & Co.) entwickelt. Puffer p_H 3,5 (Pyridin, Essigsäure, Wasser 1+9+90), Spannung 650 V, Temperatur $0^{\circ}C$, Laufzeit ca. 2 Stunden. Anschließend wurden sie mit Warmluft getrocknet und mit Ninhydrin-Sprühreagenz (Ninhydrin 0,25 g, Collidin 5 ml, Methanol 95 ml) besprüht (62). Die Nachbehandlung im Trockenschrank bei $80^{\circ}C$ beanspruchte meist 15 Minuten.

Zur Durchführung der BAYERschen Probe wurde das getrocknete Pherogramm mit alkalischer Kaliumpermanganatlösung (1 Volumen $KMnO_4$ 1% wurde mit 1 Volumen Na_2CO_3 2% versetzt) besprüht (63).

Die Laufstrecke für das unbekannte Amin betrug 19,6 cm, für Äthylamin 19,3 cm.

4.2.03 Kernresonanz-Spektrum

Das Kernresonanz-Spektrum wurde mit dem Gerät Varian A 60 aufgenommen. Temperatur $35^{\circ}C$, sweep time 500 Sekunden, sweep offset 100 Hz.

Da ich die eingesetzte Substanz noch für Tierversuche brauchte, verdünnte ich nicht mit Lösungsmittel. Aus dem gleichen Grund wurde das Spektrum mit TMS extern geeicht.

4.2.04 Optische Drehung

Eine etwa 40%ige Lösung von Gyromitrin im vorher untersuchten, optisch leeren Chloroform wurde in ein 5 cm-Rohr gefüllt und mit einem Zeiss Kreispolarimeter $0,05^\circ$ auf optische Aktivität geprüft.

Es konnte keine optische Drehung festgestellt werden.

4.2.05 Hydrazinnachweis mit p-Dimethylaminobenzaldehyd

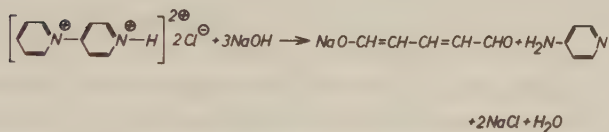
Wenig Gyromitrin wurde in einem Tropfen Wasser gelöst und mit einem Tropfen einer sauren p-Dimethylaminobenzaldehydlösung (0,4 g p-Dimethylaminobenzaldehyd werden in 20 ml Äthanol gelöst und mit 2 ml Salzsäure angesäuert) 10 Min. auf dem Wasserbad erwärmt. Nach Verdünnen mit 1 Tropfen Wasser wurde etwas von der Lösung auf Filtrierpapier getupfelt und das Papier in Salzsäure (1 : 250) gebadet. Es bildete sich ein rosa Fleck, der unter der UV-Lampe lachsrot fluoreszierte.

4.2.06 Hydrazinnachweis mit Natriumpentacyanoamminoferrat (II)

Wenig Gyromitrin wurde alkalisch hydrolisiert, neutralisiert und anschließend mit einer wäßrigen Lösung von $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_2]$ (1%) versetzt. Die Mischung färbte sich tief rot.

4.2.07 Hydrazinnachweis mit Glutaconaldehyd

Glutaconaldehyd ist nicht beständig, daher wurde er bei Bedarf durch Umsetzung von 4-Pyridyl-pyridiniumdichlorid mit Natronlauge gewonnen. Das Reagens synthetisierte ich nach einer Vorschrift von KOENIGS und GREINER (64).



Zur Durchführung der Probe wurde wenig Gyromitrin auf der Tüpfelplatte mit einem Tropfen einer wäßrigen Lösung von 4-Pyridyl-pyridiniumdichlorid (1%) vermischt, mit einem Tropfen n-Natronlauge versetzt und schließlich mit einem Tropfen konzentrierter Salzsäure angesäuert. Es trat eine tief blutrote Farbe auf.

4.2.08 Nachweis des Formylrestes

Wenig Gyromitrin wurde alkalisch hydrolysiert und mit 2 n-Salzsäure angesäuert. Nun wurde Magnesiumpulver zugesetzt, bis keine Gasentwicklung mehr auftrat. Nach Zugabe von 3 ml Schwefelsäure und wenig Chromotropsäure färbte sich die Mischung durch Erwärmen im Wasserbad bei 60°C tief violett.

4.3 SYNTHESE DES GYROMITRINS

4.3.1 Darstellung von N,N-Methylformylhydrazin

In einem kleinen Dreihalskölbchen wurden 4,6 g (0,1 Mol) Methylhydrazin tropfenweise unter Rühren mit 7,4 g (0,1 Mol) Ameisensäureäthylester in 10 ml absolutem Äthanol versetzt. Zulauf und Kühlung wurden so geregelt, daß die Temperatur bei etwa -15°C lag, jedoch nie über 0°C stieg. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Gemisch noch etwa 30 Minuten gerührt und anschließend am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel und nicht umgesetzte Ausgangsstoffe entfernt, wobei die Temperatur des Wasserbades allmählich auf 70°C gesteigert wurde. Es entstand eine viskose farblose Flüssigkeit. Ausbeute 6,3 g (85% der Theorie).

4.3.2 Darstellung von Gyromitrin

In einem kleinen Dreihalskölbchen wurden 7,4 g (0,1 Mol) N,N-Methylformylhydrazin tropfenweise unter Rühren mit 4,4 g (0,1 Mol) frischdestilliertem Acetaldehyd in 50 ml Äther versetzt. Die Reaktion wurde bei -15°C ausgeführt. Nach Beendigung der Aldehydzugabe wurde das Gemisch auf Zimmertemperatur erwärmt und 15 Minuten mit trockenem Natriumsulfat gerührt.

Das Lösungsmittel wurde nun am Rotationsverdampfer entfernt und das entstandene Gyromitrin schichtchromatographisch gereinigt. In der bei der Reindarstellung des natürlichen Pilzgiftes beschriebenen Apparatur wurde das Syntheseprodukt destilliert und in Ampullen eingeschmolzen.

4.4 UNTERSUCHUNGEN AM FRISCHPILZ

4.4.1 Gehaltsbestimmung

Etwa 40-60 g frisch gesammelte, ganze Pilze wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einer Heraeus Laborgefrieretrocknungsanlage rund 24 Stunden bei Zimmertemperatur ohne zusätzliche Heizung lyophilisiert. Die wasserfreien Lorcheln bewahrte ich zur Nachtrocknung im Vakuumexsikkator über Kieselgel auf.

Zur Gehaltsbestimmung zerkleinerte ich die Pilze in einem Porzellanmörser und extrahierte sie etwa 8 Stunden in einem Soxhlet-Apparat mit 200 ml peroxidfreiem, wassergesättigtem Äther. Der Extrakt wurde in einem 250 ml-Meßkolben bis zur Marke aufgefüllt. 40 ml dieser Lösung schüttelte ich zweimal mit je 20 ml 1 n-Salzsäure aus. Die wäßrigen Auszüge dampfte ich am Rotationsverdampfer bis fast zur Trockne ein und versetzte sie anschließend mit 50 ml 5 n Salzsäure. Die Lösung wurde mit 0,1 n Kaliumjodatlösung titriert, bis die durch das gebildete Jod entstandene Braunfärbung verblaßte. Nun wurden 8 Tropfen Amaranthlösung (1%) zugesetzt und bis zum Verschwinden der roten Farbe titriert.

1 ml 0,1 n Kaliumjodatlösung entspricht 0,00115 g Methylhydrazin oder 0,00253 g Gyromitrin.

4.4.2 Acetaldehydbestimmung nach LOHMANN

5,0 ml des oben beschriebenen, auf 250 ml aufgefüllten Ätherextrakts gefrieretrockneter Frühjahrsorcheln wurden in einem 50 ml-Kolben mit eingeschliffenem Glasstopfen mit 10,00 ml 2,4-Dinitrophenylhy-

drazin-Lösung (1 mg pro ml in absolutem, aldehyd-freiem Äthanol) und 5 ml Testbenzin Essovarsol 145/200 (verwendet wurden die von 145-157°C überdestillierenden Anteile) versetzt. Nach Zusatz von 1 Tropfen konzentrierter Salzsäure wurde die Mischung 1 Stunde auf dem Wasserbad bei 50°C erwärmt und anschließend der Äther am Rotationsverdampfer entfernt. Die Flüssigkeit wurde quantitativ in einen Scheidetrichter gebracht. Mit einer Mischung aus 15 ml Methanol, 10 ml Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1%) und 10 ml Testbenzin wurde das gebildete Hydratron extrahiert. Die Ausschüttelung wurde viermal mit 15 ml Benzin wiederholt und die vereinigten Auszüge mit wenig Natriumsulfat getrocknet. Nach Auffüllen auf 100 ml in einem Meßkolben wurde die Extinktion in 1 cm Schichtdicke bei 340 nm gegen Testbenzin gemessen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Frühljahrsorchel, *Helvella* (*Gyromitra*) *esculenta* FR. ex PERS., wird in Mittel- und Osteuropa als schmackhafter und delikater Speisepilz hochgeschätzt. Trotz dieser Beliebtheit muß die Orchel zu den gefährlichsten Giftpilzen gerechnet werden, wie die zahlreichen Vergiftungen, davon sehr viele mit tödlichem Ausgang, bezeugen.

Durch schonende Aufarbeitung eines wäßrig-alkoholischen Extraktes frischer Pilze, wobei jede Fraktion im Tierversuch auf ihre Giftigkeit geprüft wurde, konnte letztlich durch isotherme Destillation in einer Spezialapparatur der Giftstoff isoliert werden. Für die von FRANKE, FREIMUTH und LIST (34) Gyromitrin genannte toxische Verbindung wurde die Struktur eines N,N-Methylformyl-acetaldehydhydrazons ermittelt.

Die Synthese des Gyromitrins gelang durch Behandeln von Methylhydrazin mit Ameisensäureäthylester und Umsetzung des erhaltenen N,N-Methylformylhydrazins mit Acetaldehyd bei tiefer Temperatur.

Gehaltsbestimmungen ergaben, daß Frühljahrsorcheln zwischen 1250 und 1650 mg Gyromitrin/kg Frischpilz enthalten.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. FRIESE, W.,
Pharmaz. Zentralhalle, 89, 37 (1950)
2. KROMBOLZ, J.V.,
Naturgetreue Abbildung und Beschreibung der essbaren, schädlichen und verdächtigen Schwämme
J.G. Cave, Prag 1831, III, S. 30
3. LUFT, I. und NOWACKA, I.,
Roczniki panstwowego Zakladu Hig., 3, 379 (1952)
4. KARKOCHA, I. und MŁODECKI, H.,
Roczniki panstwowego Zakladu Hig., 13, 473 (1962)
5. FRANKE, S.,
Über den Giftstoff der Frühjahrslorchel Gyromitra (Helvella) esculenta Fr.
Diss. Techn. Univ. Dresden, 1965
6. GESSNER, O.,
Die Gift- und Arzneipflanzen von Mitteleuropa,
C. Winter Universitätsverlag Heidelberg, 2. Aufl. 1953
7. ORLOV, N.I.,
Sjedobuye i jadovitye griby gribenye ostravlenija i ich profilaktika, Medgiz, Moskau 1953, S. 44
8. SEIDEL,
Pilz- und Kräuterfreund 1920, S. 14 u. 1923, S.100
zit. nach Kärber
9. PICK, E.,
Dtsch. med. Wschr., 53, 1563 (1927)
10. v. TEODOROWICZ, F.
Z. Pilzk., 10, 66 (1931)
11. STUHLFAUTH, K. und F. JUNG
Samml. Vergiftungsfälle, Arch. Toxikol.,
14, A 998, 86 (1952)
12. BOSTROEM, E.,
Dtsch. Arch. klin. Med. 32, 209 (1883)
13. DITTRICH, G.,
Ber. dtsh. bot. Ges. 35, 27 (1917)
14. HERZOG, G.,
Münchener med. Wschr. 44, 1366 (1917)

15. UMBER, F.,
Dtsch. med. Wschr. 42, 627 (1916)
16. WELSMANN, L.,
Z. Pilzk., 13, 119 (1934)
17. UNGER, R.,
Med. Klin., 27, 14 (1931)
18. GUTZEIT, R.,
Dtsch. med. Wschr., 55, 1342 (1929)
19. WELSMANN, L.
Z. Pilzk., 10, 5 (1931)
20. KALLENBACH, F.,
Z. Pilzk., 15, 16 und 109 (1936)
21. SCHUELER,
Berliner klin. Wochenschrift 1880, S. 659
zit. nach Bostroem
22. HUSEMANN, Th.,
Zeitschrift f. prakt. Heilkunde 2, 221 (1865)
23. KEBER,
Medicinische Zeitung, herausgeg. von dem Verein
f. Heilkunde in Preussen, 15, 149 (1846)
24. LORINSER,
Die wichtigsten essbaren, verdächtigen und gif-
tigen Schwämme, Wien 1881
zit. nach Bostroem
25. PONFICK, E.,
Virchow's Arch. pathol. Anatom. Physiol. klin.
Med. 88, 445 (1882)
26. Bundes-Anzeiger 17, Beilage zu Nr. 101 vom
2. Juni 1965, S. 15,
Bekanntmachung von Leitsätzen für das Deutsche
Lebensmittelbuch
27. WELSMANN, L.,
Med. Klin., 27, 809 (1931)
28. BOEHM, R. und E. KUELZ,
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Phar-
makol., 19, 403 (1885)
29. AYE, D.,
Arch. Pharmaz. 271, 537 (1933)
30. REIF, G.,
Z. Lebensmittel-Unters. u. Forsch.
69, 585 (1935); 71, 435 (1936); 76, 30 (1938)

31. SAKAGUCHI, K., T. INONE und S. TADA,
J. Agr. Chem. Soc. Japan., 13, 241 (1937)
32. BIRKINSHAW, J.H., A. BRACKEN und H. RAISTRICK,
Biochem. J., 39, 70 (1945)
33. PREGI, F.,
Die quantitative organische Mikroanalyse,
J. Springer, Berlin 1923, S.206
34. FRANKE, S., U. FREIMUTH und P.H. LIST,
Arch. Toxikol., 22, 293 (1967)
35. EMICH, F.,
Mh. Chem., 38, 219 (1917)
36. EGE, G.,
Zahlentafel zur Elementaranalyse,
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1966, S. XV
37. FEIGL, F.,
Tüpfelanalyse Bd. II: Organischer Teil,
Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main
1960, S. 303
38. FEIGL, F., V. ANGER und O. FREHDEN,
Mikrochemie, 15, 181 (1934)
39. ANGER, V. und S. OFRI,
Mikrochim. Acta, 1964, 626
40. SCHMITZ, E. und P. HABISCH,
Chem. Ber., 95, 680 (1962)
41. MUELLER, E. und W. RUNDEL,
Chem. Ber. 89, 1065 (1956)
42. HUFFMANN, C.W.,
J. org. Chemistry, 23, 727 (1958)
43. HAMMICK, D.Ll. und D. VOADEN,
J. chem. Soc., 1961, S. 3302
44. KENNER, J. and K. MACKAY,
Nature London, 160, 465 (1947)
45. PEDERSEN, C.Th.,
Acta chem. scand., 18, 2199 (1964)
46. KOLTHOFF, I.M. and R. BELCHER,
Volumetric Analysis Vol. III.,
Interscience Publishers, New York 1957, S. 456
47. Mc KENNIS, H.jr. and A.S. YARD,
Analytic. Chem., 26, 1960 (1954)

48. LOHMANN, F.H.,
Analytic. Chem., 30, 972 (1958)
49. JACOBSON, K.H., J.H. CLEM, H.J. WHEELWRIGHT,
W.E. RINEHART and N. MAYES,
Arch. Ind. Health, 12, 609 (1955)
50. HORITA, A. and W.R. Mc GRATH,
Proc. Soc. exp. Biol. Med., 103, 753 (1960)
51. MOESCHLIN, S.,
Klinik und Therapie der Vergiftungen, 3. Aufl.,
Gg. Thieme Verlag, Stuttgart 1959, S. 161
52. KELLY, R.B.,
J. Org. Chemistry, 27, 3229 (1962)
53. O'BRIEN, R.D., M. KIRKPATRICK and P.S. MILLER,
Toxicol. appl. Pharmacol., 6, 371 (1964)
54. MEDINA, M.A.,
J. Pharmacol. exp. Therapeut., 140, 133 (1963)
55. WEIR, Francis W., J.M. NEMENZO, S. BENETT,
F.H. MEYERS,
AD 601234, zit. nach C.A., 62, 3313 (1965)
56. FRIERSON, W.B.,
Ind. Med. Surgery, 34, 650 (1965)
57. KAISER, R.,
Chromatographie in der Gasphase. Hochschul-
taschenbuch 22/22a,
Bibliographisches Institut, Mannheim 1965
58. HOUBEN, I. und Th. WEYL,
Methoden der organischen Chemie, Band II,
Analytische Methoden,
Gg. Thieme Verlag, Stuttgart 1953, S. 9
59. ORGANIKUM,
Organisch-chemisches Grundpraktikum, 3. Aufl.,
VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften,
Berlin 1964, S. 356
60. MEHLITZ, A., K. GIER SCHNER und Th. MINAS,
Chemiker-Ztg./Chem. Apparatur, 87, 573 (1963)
61. ORGANIKUM,
Organisch-chemisches Grundpraktikum, 3. Aufl.,
VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften,
Berlin 1964, S. 552
62. MERCK, E.,
Anfärbereagentien für Dünnschicht- und Papier-
chromatographie, E. Merck AG, Darmstadt, S. 39

63. MERCK, E.,
Anfärbereagentien für Dünnschicht- und Papier-
chromatographie, E. Merck AG, Darmstadt, S. 32
64. KOENIGS, E. und H. GREINER,
Chem. Ber., 64, 1052 (1931)
65. BELLAMY, L.J.,
Ultrarot-Spektrum und chemische Konstitution,
Dr. D. Steinkopf Verlag, Darmstadt, 1966
66. KAERBER, G.,
Samml. Vergiftungsfällen, 3, C7, 1 (1932)
67. SUHR, H.,
Anwendungen der kernmagnetischen Resonanz in der
organischen Chemie, Springer Verlag, Berlin-
Heidelberg-New York, 1965
68. SPITELLER, G.,
Massenspektrometrische Strukturanalyse organi-
scher Verbindungen,
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 1966

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. P. H. List an dieser Stelle meinen wärmsten Dank auszusprechen, daß er mir jederzeit seine reiche Erfahrung und seine wertvollen Ratschläge bei der Ausführung der Arbeit zuteil werden ließ.

Großen Dank schulde ich Herrn Professor Dr. W. Schmid, der mir für die Tierversuche großzügig die Einrichtungen seines Institutes und Versuchstiere zur Verfügung stellt.

Besonders wichtige Hilfe erhielt ich auch von Herrn Rau, dem ich dafür herzlich danken möchte.

Des weiteren gilt mein Dank Herrn Oberförster Koch, der mir liebenswürdigerweise einen Standort der in der Marburger Umgegend seltenen Frühjahrsorchel zeigte, sowie Herrn K.-H. Schulz, der mich in zahlreichen technischen Dingen unterstützte.

LEBENS LAUF

Am 11. Februar 1938 wurde ich in Gießen geboren. Hier verbrachte ich auch meine Kindheit bei meinen Eltern Karl Luft, Kaufmann, und Ehefrau Edith, geb. Fourier.

Von Herbst 1944 bis Ostern 1949 besuchte ich die Volksschule in Gießen und anschließend die dortige Liebigsschule, an der ich nach 9jährigem Schulbesuch am 4. März 1958 die Reifeprüfung ablegte.

Nach dem Abitur trat ich als Wehrpflichtiger in die Bundeswehr ein. Ich leistete den verlängerten Grundwehrdienst ab und schied am 30. September 1959 als Leutnant der Reserve aus dem Truppendienst aus.

Auf Grund meiner naturwissenschaftlichen Interessen wollte ich Apotheker werden und trat am 1. Oktober 1959 in die Starkenburg-Apotheke in Heppenheim als Praktikant ein. Am 19. September 1961 bestand ich in Darmstadt die Pharmazeutische Vorprüfung und studierte ab WS 1961/62 Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg. Hier legte ich nach sechs Semestern am 10. Oktober 1964 die Pharmazeutische Prüfung ab.

Im Frühjahr 1965, nach Absolvierung eines Fortgeschrittenenpraktikums, begann ich unter Leitung von Herrn Prof. Dr. P.H. List meine Doktorarbeit über das Gift der Frühlingslorchel, die ich im Sommer 1967 abschloß.

